

## 明細書

## プラスチックの分解法及びそれを利用した有用物質の製造方法

## 5 技術分野

本発明は、プラスチック結合性タンパク質の存在下でプラスチックを分解する方法、特に、アスペルギルス・オリゼ又はアスペルギルス・ソーヤの作用によりプラスチックを分解する方法、更に、生分解性プラスチックに微生物を接触させ、  
10 プラスチックを分解する過程で、プラスチック中の炭素を微生物により新たな有用物質に転換する生産技術、並びに、以上の方法に使用される各種のタンパク質及びそれをコードする遺伝子等に関するものである。

## 背景技術

15

日本のプラスチックの需要量は、1997年の統計によれば1400～1500万トンに達し、そのうち900万トン以上が廃棄プラスチックとして排出されており、環境問題及び化石燃料の消費抑制の観点から対応が必要とされている(社団法人プラスチック処理協会発行「プラスチックリサイクルの基礎知識」)。その対策として、石油化学系プラスチックの焼却による炭酸ガスおよびダイオキシン類の発生と、非分解性プラスチックの環境への廃棄の抑制を目的に、生分解性プラスチックが開発されてきた。生分解性プラスチックは、2010年には全プラスチックの約3-7%、すなわち50-100万トン/年の流通量が予測されているが(「生分解性ポリマーの市場拡大シナリオ」株式会社富士キメラ総研版、23頁)、現状の技術で  
20 ある生分解性プラスチックの自然土壌中における分解処理許容量の限界と生  
25 分解性プラスチック自身のコスト高が問題として指摘されている。

ところで、糸状菌の中でも、特にアスペルギウス・オリゼ(キコウジ菌)等を含む

麹菌は、清酒、みそ、醤油、及び、みりん等を製造する、わが国における醸造産業において古くから利用され、直接に食されてきた菌類であり、米国のFDA(食品医薬局)によりGRAS(Generally Recognized as Safe)にリストアップされている安全な遺伝子源である。

5

更に、麹菌は、蛋白質などを菌体外に分泌する能力に優れており、その為に、様々な有用物質の生産に利用されている。

10 特許文献1には、微生物として放線菌の一種であるアミコラトプシス・メディテラーネイHT-6を用いてポリブチレンサクシネート系樹脂を分解する方法が記載されている。

特許文献2には、リパーゼ及びクチナーゼ等の酵素を用いる生分解性ポリマーの酵素分解方法が記載されている。

15

これらの方法ではバイオサーファクタントを反応系に共存されることについては何等開示されていない。又、プラスチック分解成分以外の有用物質を製造することについても何等教示されていない。

20 特許文献1： 特開平9-25271号公報

特許文献2： 特表2001-512504号公報

25 現状の生分解性プラスチック分解技術は土壌中での微生物によるプラスチックの水と二酸化炭素への単純な分解を前提としており、有用付加価値物質への転換を前提にはしていない。この状況は国内外を問わず同じである。現在の生分解性プラスチックは従来の石油化学系プラスチックに比較してコスト高(3~5倍)であり(「'01生分解性ポリマーの現状と新展開」株式会社ダイリサーチマーテック、株式会社中央リサーチセンター版 513-521頁)、コ

ストダウンあるいは何らかのコスト回収技術が求められている。

更に、生分解性プラスチックの土壌埋め立てによる分解は、もっぱら地表近く(深さ30 ~ 50cm程度)のみで行なわれているが、元来土壌中の菌密度は  
5 少なく、深い部分に至ってはさらに菌密度が低下することから、自然界における土壌中での分解速度は遅い。したがって、生分解性プラスチックの需要が予測通りに拡大した場合、大量に廃棄されるプラスチック負荷を土壌中での分解で賄いきるのは不可能である。さらに、国土の狭い日本においては広大な埋め立て分解地の確保が困難であり、廃棄量の多い都市近郊では特に問題となる。現在は包装材・農業資材・コンポスト対応包材が先行しているが、  
10 今後、自動車内装部品、コンピュータ・家電包材など大量消費財への生分解性プラスチックの利用が進展した場合、生分解性プラスチックの高密度処理施設が必要となる。生分解性ポリマー使用に関する問題点としても各種アンケート結果によれば、コスト高と同時に大量処理施設のインフラ整備が指摘されている(「'01生分解性ポリマーの現状と新展開」株式会社ダイリサーチマーテック、株式会社中央リサーチセンター版 513-521頁)。  
15

これらの課題に対して、本発明者らは鋭意研究した結果、全く新しいコンセプトとして、バイオサーファクタントのような界面活性物質とプラスチック分解酵素を生産する微生物あるいは界面活性物質及び／又はプラスチック分解酵素そのものを活用することで、高密度のプラスチックの大規模分解を効率的  
20 に進行させることに加えて、酵素タンパク質や抗生物質などの有用物質生産性の高い微生物(糸状菌や放線菌)を用いることによって、有用物質の生産も同時に行うことができる新規な方法を発明するにいたった。

25

#### 発明の開示

本発明は、プラスチック結合性タンパク質等のバイオサーファクタントがプラス

チックの疎水表面に吸着し、それによって、プラスチック分解酵素と共同してプラスチックの分解を有効に促進することできる、という新たな知見に基づくものである。

- 5      即ち、本発明は第一の態様として、プラスチック結合性タンパク質等のバイオサーファクタントの存在下でプラスチックを分解する方法、特に、プラスチック分解酵素を用いてプラスチックを分解する方法に係る。

- 10      本発明は、第二の態様として、プラスチックに微生物を接触させ、微生物の作用によりプラスチックを分解し、更に、分解されたプラスチックの成分を微生物により有用物質に転換することから成る、プラスチックから有用物質を製造する方法に係る。

- 15      この方法は、プラスチック廃材を微生物の発酵基質として分解しつつ、付加価値の高い有用物質（酵素・医薬品・化成品など）の生産に転換する新たな分解・物質生産が可能な循環再生システムとして有用である。

- 20      ここで、有用物質の種類に特に制限はなく、当業者に公知の任意の物質を包含するが、例えば、有用物質の生合成系に関与する酵素等のタンパク質、一次代謝産物（有機酸等）、二次代謝産物（抗生物質及び化成品前駆体等）、及びバイオサーファクタント等を挙げることが出来る。特に、有用物質が菌体外に分泌される物質である場合には、製造した後の精製等の操作が容易となり、効率及び経済性の点で有利である。又、プラスチックが分解されたときに得られるモノマー及びオリゴマーもプラスチック再生のための原料として有用であるの  
25      で、有用物質に含めることが出来る。

プラスチックを分解する微生物と、分解されたプラスチックの成分を有用物質に転換する微生物とは、同一であってもよいし、夫々別の種類の微生物でも良

い。

- 分解されたプラスチックの成分を有用物質に転換する為に使用する微生物としては、例えば、紫外線照射、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)等の薬剤による突然変異処理で得ることが出来、有用物質を高発現する変異株を挙げることが出来る。更に、以下に記載するような、有用物質の生合成系に関与する酵素等の各種の有用物質をコードする遺伝子によって組換えられ、該酵素を高発現する形質転換菌を使用することが好ましい。
- 10 更に本発明は、第三の態様として、バイオサーファクタント及び／又はプラスチック分解酵素の共存下で、プラスチックに微生物を接触させ、微生物の作用によりプラスチックを分解することから成る、プラスチックを分解する方法に係る。

- 15 以上の本発明の各態様で使用する微生物は、プラスチックを分解する能力、又は、分解されたプラスチックを転換して有用物質を産生する能力を有するものである限り、特に制限はないが、微生物の代表例として、糸状性細菌及び真核糸状真菌を挙げることが出来る。

- 20 糸状性細菌の例としてはストレプトマイセス属等の放線菌がある。更に、ストレプトマイセス属のストレプトマイセス・グリゼウスまたはストレプトマイセス・セリカラーを挙げることが出来る。

- 25 一方、真核糸状真菌としては、アスペルギルス(Aspergillus)属、ペニシリウム(Penicillium)属、トリコデルマ(Trichoderma)属、リゾプス(Rhizopus)属、ムコーラ(Mucor)属、フミコーラ(Humicola)属、マグナポルサ(Magnaporthe)属、メタリチウム(Metarhizium)属、ノイロスポラ(Neurospora)属、モナスカス(Monascus)属、アクレモニウム(Acremonium)属及びフザリウム(Fusarium)属を挙げることが出来る。アスペルギルス(Aspergillus)属には、アスペルギルス・オ

リゼ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ソーヤ (*Aspergillus sojae*)、及びアスペルギルス・ニドランス (*Aspergillus nidulans*)等が包含される。

5 この中で、アスペルギルス・オリゼRIB40株 (FERM P-18273)は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1丁目1番地1)に平成13年3月28日付けで寄託されている。

10 更に、*Aspergillus oryzae* pN-cha株 (クチナーゼ、ハイドロホービン、アミラーゼ三重高発現株)は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約に基づき、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1丁目1番地1)に2003年(平成15年)9月11日付けで国際寄託され、受託番号:FERM BP-08486を付されている。

15 更に、上記の糸状性細菌及び真核糸状真菌等から当業者に公知の遺伝子工学的手法によって得られる各種形質転換菌も本発明で有利に使用することが出来る。

20 即ち、本発明のハイドロホービン等のプラスチック結合性タンパク質若しくはバイオサーファクタントをコードする遺伝子を含むDNA、クチナーゼ等のプラスチック分解酵素をコードする遺伝子を含むDNA、及び、有用物質(例えば、有用物質の生合成や、高分子物質の低分子化、各種転位反応により有用物質を生成するような酵素である水酸化酵素や酸化酵素、ポリケタイド合成酵素、チトロームオキシダーゼ、エステラーゼ、フェノールオキシダーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ、セルラーゼ、リパーゼ、及びプロテアーゼ)をコードする遺伝子を含むDNAから選  
25 択される少なくとも一つ以上のDNAによって組換えられた形質転換菌を挙げることが出来る。これらの形質転換菌は、該界面活性物質を高発現し、プラスチック分解酵素を高発現し、又は有用物質の生合成に関与する酵素を高発現することが可能である。

従って、本発明は、第四の態様としてこのような各種形質転換菌にも係るものである。

このような形質転換菌を作成する元となる微生物の例として、上記の微生物  
5 以外に、アスペルギルス属であるアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、  
アスペルギルス・アワモリ (*Aspergillus awamori*)、アスペルギルス・カワチ  
(*Aspergillus kawachii*)、アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*)、ア  
スぺルギルス・フラバス (*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・パラシティクス  
(*Aspergillus parasiticus*)、アスペルギルス・ノミウス (*Aspergillus nomius*)、ア  
10 スペルギルス・タマリ (*Aspergillus tamaris*) 及びアスペルギルス・レペンス (*Aspergillus repens*) 等を挙げることが出来る。

更に、第五の態様として、本発明は、上記の方法等に使用することが出来る  
、新規なプラスチック結合性タンパク質及びプラスチック分解酵素、並びに、これ  
15 らをコードする遺伝子に係る。それらは、特に、アスペルギルス・オリゼ由来のも  
のである。

#### 図面の簡単な説明

20 図1は、*A. oryzae* 等のアスペルギルス属糸状菌がPBS転換能力を持つことを確認した写真である。

図2は、*A. oryzae*がPLA転換能力を持つことを確認した写真である。

図3は、DNAマイクロアレイ解析用の培地の組み合わせを示す。

図4は、PBS存在時に特異的に発現する遺伝子群を模式的に示す。

25 図5は、Su3PP5、Su3PE5、Su3Bu5のDNAマイクロアレイの結果を視覚的に解析した結果であり、各数字は、遺伝子発現を(Cy5/Cy3)の比で表わしている。

図6は、ハイドロホービンの完全長を含むJZ3981の塩基配列を示す。

図7は、麹菌用ハイドロホービン高発現プラスミドの構築を示す模式図である。

図8は、ハイドロホービン高発現麹菌が高度にハイドロホービンを培養上清に分泌していることを示すゲル電気泳動(SDS-PAGE)の写真である。

5 図9は、PBS 分解酵素であるクチナーゼ遺伝子が染色体 DNA 中に挿入されたアスペルギルス・オリゼ形質転換株の培養上清中にのみPBS 分解酵素精製標品と同じ位置にタンパク質が発現していることを示すゲル電気泳動(SDS-PAGE)の写真(左)、及び該形質転換株によるPBSの分解を示す写真(右)である。

10 図10は、glaA 142 promoter を目的遺伝子の上流に融合した pPTR-gla-hyp の作製を示す。

図11は、クチナーゼ-ハイドロホービン共高発現株が取得されたことを示す、SDS-PAGE の写真である。

15 図12は、ハイドロホービン高発現用プラスミド pPTR-eno-hyp の作製を示す。

図13は、麹菌  $\alpha$  アミラーゼ高発現用プラスミド pNG-amy の作製を示す。

図14は、クチナーゼ-ハイドロホービン- $\alpha$  アミラーゼ三重共高発現株がハイドロホービンを高発現することを示す、SDS-PAGE の写真である。

20 図15は、glaA 142 promoter をhyp B遺伝子の上流に融合させた pNG-gla-hyp Bの作製を示す。

図16は、glaA 142 promoter をhydrophobin-315遺伝子の上流に融合させた pNG-gla-hydrophobin-315 の作製を示す。

図17は、糸状菌由来ハイドロホービン及びその類似体の系統樹を示す。

25 図18は、各種生分解性プラスチックへのハイドロホービンの吸着の様子を示す。

図19は、糸状菌由来タンパク質分解酵素及びその類似体の系統樹を示す。

図20は、PBS分解培養上清中のオクチルセルロフィンカラムの溶出画分中のタンパク質濃度を示すグラフ、及び各画分中に含まれるタンパク質の存在



を示すSDS-PAGE の写真である。

図21は、PBS結合タンパク質高発現系の構築を示す。

図22は、アスペルギルス・オリゼ形質転換株の培養上清中にのみ目的タンパク質の位置(約14 kDa)にバンドが観察されたことを示すSDS-PAGE の写真である。

図23は、疎水表面上での約14 kDaタンパク質及びハイドロホービン高発現株の生育が野性株のものを上回ることを示す写真である。

図24は、インビトロでのPbpAのPBSへの吸着を示すSDS-PAGE の写真である。

10 図25は、PbpA及びPbpB相同配列の系統樹を示す。

図26は、白金線PBS被覆物のクチナーゼによる分解を示す写真である。

図27は、RoiAによるPBSフィルムのクチナーゼ分解の促進を示す写真である。

15 図28は、in vitroでのRoiAのクチナーゼによるPBS乳化液分解促進効果を示す。

図29は、PbpAをPBSに吸着させた際の分解促進の様子を示す。

図30は、PBSフィルムのクチナーゼ分解に対するハイドロホービン及び人工界面活性剤との比較を示す。

## 20 発明を実施するための最良の形態

本発明の第一の態様において使用するバイオサーファクタントは、一般的に、生物が生産する界面活性剤であり、特に、微生物が菌体外に生産する界面活性剤であり、菌体プラスチック吸着因子の一種である。

25

バイオサーファクタントとしては、プラスチック結合性タンパク質以外に、当業者に公知の任意の物質、例えば、リン脂質や親水性の糖と疎水性の脂肪酸が結合しているグリコリピド等がある。例えば、マンノシルエリスリトールリピッド及

びラムノリピッド等の糖脂質エステル、環状リポペプチド、環状ポリペプチド、並びに、サーファクチン等の両親媒性タンパク質等を挙げることが出来る。

5 プラスチック結合性タンパク質は、以下の実施例で具体的に示されるような  
5 ハイドロホービン及びそのホモログ類、並びにその他のプラスチック結合性タン  
パク質を挙げることが出来る。その取得源に特に制約はないが、上記の各種の  
糸状性細菌及び真核糸状真菌由来のもの、特に、以下の実施例に具体的に  
記載したような、アスペルギルス・オリゼ等のアスペルギルス属カビに代表される  
糸状性細菌などの各種微生物由来のものを使用することが出来る。

10

一方、本発明方法で使用するプラスチック分解酵素も当業者に公知の任意  
のものを使用することが出来る。例えば、エステラーゼ、プロテアーゼ、ペプチダ  
ーゼ、リパーゼ、クチナーゼ、及びセリンハイドrolラーゼ等から選択される少なくと  
15 も一種を使用することが出来る。プラスチック分解酵素も、上記の各種の糸状  
性細菌及び真核糸状真菌由来のもの、特に、以下の実施例に具体的に記載  
したような、例えば、アスペルギルス・オリゼ等のアスペルギルス属カビに代表さ  
れる糸状性細菌などの各種微生物由来のものを使用することが出来る。

20 従って、例えば、プラスチック結合性タンパク質としてアスペルギルス・オリゼ由  
来のハイドロホービン、プラスチック分解酵素としてアスペルギルス・オリゼ由来  
のクチナーゼを使用することが出来る。

本発明方法で分解の対象となるプラスチックに、特に制限はない。その代表  
25 例として、「生分解性プラスチック」として知られているものを挙げることが出来る  
。

生分解性プラスチックとは、「使用状態ではその使用目的において必要とされ

る充分な機能を保ち、廃棄されたときには土中又は水中の微生物の働きによって、より単純な分子レベルにまで分解されるプラスチック」ともいうべき物質である。分解の程度に基づいて、「完全分解型生分解性プラスチック」と「部分分解（崩壊）型生分解性プラスチック」とに分けられ、更に、材料及び製造方法から

5 は、「微生物生産系」、「天然高分子系」及び「化学合成系」に大きく分けることが出来る。本発明方法では、これらのいずれの種類の生分解性プラスチックも使用することが出来る。

従って、本発明方法において用いられるプラスチックの具体例は、例えば、ポリ

10 リエステル、ポリウレタン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニール、ナイロン、ポリスチレン、デンプン、及びそれらの混合物から成る群から選択される。更に、ポリエステルとしては、ポリブチレンサクシネート（PBS）、ポリブチルサクシネート・アジペート（PBSA）、ポリ乳酸（PLA）、脂肪族ポリエステル、ポリカプロラクトンそれらの混合物から成る群から選択される。

15

更に、本発明の全ての方法において、分解の対象となるプラスチックは、所謂「複合材料」の一構成要素として含まれているものでもよい。ここで、「複合材料」とは一般的に2種類以上の異なる物質から構成されている材料であり、例えば、プラスチックと各種金属及びその他の無機物質から構成されているものが

20 ある。このような複合材料は各種産業素材として多方面で各種の目的に利用されている。

従って、本発明により、プラスチックを含む複合材料から、プラスチック部分を選択的に分解して、プラスチックをモノマー又はオリゴマーとして回収し、一方で

25 、プラスチックを実質的に含まない金属等のその他の部分を回収することが出来る。

本発明方法において、プラスチックの分解反応は、目的・規模などに応じて、

当業者に公知の任意の反応系（例えば、水溶系及び固相系）及び反応条件を適宜選択して実施することが出来る。例えば、プラスチック乳化液を含む液体培養系及びプラスチック固型ペレット又はプラスチック粉体等を使用する固体培養系等の当業者に公知の任意の培養系において行うことが出来る。

5

従って、分解の対象となるプラスチックは、乳化液状及び固型ペレット等の、夫々の培養系に応じた任意の形態をとることが出来る。

10 本発明の第一の態様において、バイオサーファクタントの存在下でプラスチックを分解させるためには、バイオサーファクタントを反応系に添加する必要があるが、その添加量、時期、手段及び方法等は当業者が適宜選択することが出来る。

15 本発明の効果を得るには、まず、バイオサーファクタントがプラスチックに効果的に吸着するように両者間の疎水的相互作用が強まるような条件下で処理することが好ましい。

20 その為に、本発明方法の好適例としては、低水分活性状態でバイオサーファクタントをプラスチックと混合するステップ、高水分活性状態でプラスチック分解酵素によりプラスチックを分解するステップからなる。

25 ここで、「水分活性」は当業者に公知の因子であり、「溶質の溶けた水溶液と純粋の蒸気圧との比を水分活性」と定義するものである(John A. Troller & J. H. B. Christian著, "Water Activity and Food" Academic Press, Inc.)。本発明において、「低水分活性状態」とは、バイオサーファクタントがプラスチックの疎水表面に有効に吸着できるような条件を意味し、具体的には、例えば、水分活性が0.97以下、好ましくは0.95以下、さらに好ましくは、0.9以下であるような状態をいう。又、「高水分活性状態」とは、このような低水分活性状態ではない状

態を意味する。この時の溶質としては、例えば、塩類、糖類、アルコール類などが挙げられる。

- 5 従って、一具体例として、低水分活性状態でフィルム状又はペレット状のプラスチックとバイオサーファクタントを混合して、該プラスチックに有効量のバイオサーファクタント吸着させ、その後、水分活性を高めてプラスチック分解酵素により該フィルムの分解を促進させることが可能である。

- 10 或いは、バイオサーファクタントがプラスチックの間の疎水的相互作用が強まるような別の好適例としては、高塩濃度状態でバイオサーファクタントをプラスチックと混合するステップ、低塩濃度状態でプラスチック分解酵素によりプラスチックを分解するステップからなる。ここで、「高塩濃度状態」とはバイオサーファクタントがプラスチックの疎水表面に有効に吸着できるような条件を意味し、具体的には、例えば、塩としてNaClを用いた場合、濃度が4%以上、好ましくは8%以上、さらに好ましくは14%以上であるような状態をいう。又、「低塩濃度状態」とは、このような高塩濃度状態ではない状態を意味する。しかしながら必ずしも低溶質濃度状態でプラスチック分解酵素を作用させる必要はなく、高溶質濃度状態で、サーファクタントを結合させ、その状態でプラスチック分解酵素を作用させることもできる。

20

又、本発明方法の反応温度としては、例えば、0～100℃、好ましくは、0～80℃、より好ましくは、15～80℃である。

- 25 更に、プラスチックの分解により発生するモノマー及びオリゴマーなどの酸性物質の影響で反応溶液が酸性化し、その結果、反応系のpH値がプラスチック分解酵素の至適pH範囲から外れることがあるので、それを防ぐために、分解反応を高緩衝能を有する緩衝液中で実施したり、又は、分解反応中に、外部から塩基性物質を加えるなどして適宜反応系を中和し、適当な中性状態、例えば、p

H4～11、好ましくはpH6～10、より好ましくはpH7～9に維持することが好ましい。

更に、バイオサーファクタント及びプラスチック分解酵素は、夫々、タンパク質  
5 製剤として使用することも出来るし、このようなタンパク質製剤を用いずに、プラスチックにアスペルギルス・オリゼ又はアスペルギルス・ソーヤを接触させ、アスペルギルス・オリゼ又はアスペルギルス・ソーヤがその場で産生するバイオサーファクタント及びプラスチック分解酵素の作用によりプラスチックを分解することも可能である。

10

本発明の第二～第四の各態様において、バイオサーファクタント及び／又はプラスチック分解酵素を培養系に共存させることにより、プラスチックの分解を促進することが出来る。これらの物質は微生物自体により産生されたものでも  
15 良いし、それらに加えて、更に培養系の外部より添加することが可能である。添加の量及び割合・添加の時期等の諸条件は当業者が適宜選択することが出来る。これらの物質は必ずしも同時に添加する必要はなく、方法の各段階で逐次的に添加することも可能である。

20 界面活性物質若しくはバイオサーファクタントを反応系又は培養系に共存させることにより、微生物のプラスチックへの接触を増強することが出来、プラスチックの分解効率を促進させることが出来る。

培養系に共存させることができるバイオサーファクタント及び／又はプラスチック  
25 分解酵素は、既に本発明の第一の態様において記載したものである。

既に記載したように、本発明方法においては、バイオサーファクタント、プラスチック分解酵素、及び／又は有用物質を高発現する形質転換菌を使用するこ

とによって、プラスチックを分解し、分解されたプラスチックを有用物質に転換することをより促進することが可能となる。

本発明方法においては、上記各物質をコードする遺伝子を夫々別の微生物  
5 に導入して、こうして得られた複数種類の形質転換菌を用いて反応させることができる。即ち、バイオサーファクタントをコードする遺伝子によって組換えられた形質転換菌、プラスチック分解酵素をコードする遺伝子によって組換えられ形質転換菌、及び、有用物質遺伝子によって組換えられ形質転換菌のうちの任意の組み合わせからなる複数の形質転換菌を使用することによって本発明の  
10 各方法を実施することができる。

尚、本発明の形質転換菌において導入される、バイオサーファクタント、プラスチック分解酵素、又は有用物質をコードする遺伝子は一種類とは限らず、夫々、複数種類のバイオサーファクタントの遺伝子、複数種類のプラスチック分解酵  
15 素の遺伝子、又は複数種類の有用物質の遺伝子で組換えることも可能である。

或いは、実施例に記載されているように、同一の微生物をバイオサーファクタント、プラスチック分解酵素をコードする双方の遺伝子によって組換えられた、こ  
20 の両物質が同時に高発現される共高発現菌である形質転換菌を使用することが出来る。その結果、プラスチック分解酵素を生産する微生物菌体がプラスチック表面により強く吸着して、プラスチック分解酵素を生産することからプラスチック分解が促進される。

25 こうして得られたプラスチックを分解する能力のある形質転換菌と有用物質生産用の微生物の2種類の微生物を共存させて培養することによって有用物質の製造を行なうことも可能である。

更に、実施例に記載されているように、同一の微生物をバイオサーファクタント、プラスチック分解酵素、及び有用物質の夫々をコードする遺伝子によって組換えられた、これらの物質が同時に高発現される三重共高発現菌である形質転換菌を使用することが出来る。

5

例えば、上記の共高発現菌を元の菌株として使用して、既に記載したように、有用物質を高発現する変異株、又は、有用物質をコードする遺伝子によって組換えられこれらの物質を高発現する形質転換菌を作成することによって、プラスチック分解能を高めた微生物に有用酵素の遺伝子を導入して高発現させることが可能となり、こうして得られる一種類の三重共高発現菌である形質転換菌を使用することによって、プラスチックを分解すると同時に有用物質の生産を効率よく行なわせることができる。

10

本発明において、複数種類の微生物を使用する場合には、これら複数種類の微生物を同時に培養する共培養系で実施したり、又は、本発明方法が夫々分解反応及び転換反応を担う複数の連続的な培養段階から構成されており、その各段階において、夫々前の段階で得られた培養液に更に異なる微生物を逐次的に作用させて処理することも可能である。

15

又、以上のような各種形質転換菌を使用した場合でも、更に、界面活性物質若しくはバイオサーファクタント及び／又はプラスチック分解酵素を、例えば外部より添加することによって反応系に共存させ、プラスチックの分解及び転換を更に効率化することも可能である。

20

界面活性物質としては、当業者に公知の任意の物質を使用することが出来る。しかしながら、生物、特に、微生物が細胞表面又は菌体外に生産する生物系界面活性物質であるバイオサーファクタントが環境面等の点で好ましい。

25



本発明の微生物を利用してプラスチックを分解する方法、及び、プラスチックから有用物質を製造する方法において、分解反応及び転換反応は、プラスチック乳化液を含む液体培養系及びプラスチック固型ペレット又はプラスチック粉体等を使用する固体培養系等の当業者に公知の任意の培養系において行うことが出来る。

従って、分解の対象となるプラスチックは、固型ペレット状及び乳化液等の、夫々の培養系に応じた任意の形態をとることが出来る。培養液及び培地等の組成、並びに、温度、pH等の各種培養温度条件は、プラスチック及び使用する微生物の種類等に応じて当業者が適宜選択することが出来る。

ただし、既に記載したように、バイオサーファクタントとプラスチック分解酵素とが共同して有効に作用してプラスチックを分解させるためには、まず、バイオサーファクタントがプラスチックに効果的に吸着するように両者間の疎水的相互作用が強まるような条件下で処理することが好ましい。

従って、例えば、プラスチックに緩衝液等を添加して適当な低水分活性状態とした後、本発明の形質転換菌のような微生物の菌体(細胞、孢子、菌糸など)を接種して恒温恒湿器内で培養して麹を作成し、それによって、微生物が産生するバイオサーファクタントがプラスチックに作用した後、適当な緩衝液を加えて高水分活性状態にし、プラスチック分解酵素によりプラスチックを分解する方法が考えられる。この際に、外部からの界面活性剤又はバイオサーファクタントの添加は低水分活性状態で行ない、一方、プラスチック分解酵素の添加は高水分活性状態で行なうことが好ましい。

25

尚、既に記載したように、分解する際には、プラスチックの分解により発生するモノマー及びオリゴマーなどの酸性物質の影響を防ぐために、高緩衝能を有する緩衝液を使用したり、又は、分解反応中に、外部から塩基性物質を加える

などして適宜反応系を中和し、中性状態に維持することが好ましい。

本発明で使用するアスペルギルス・オリゼ由来のハイドロホービン及びハイド  
5 ロホービンホモログ遺伝子の具体例として、以下の(a)又は(b)ポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA:

(a)配列番号:1、2又は3で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチド、(b)(a)で示されるアミノ酸配列において、一部のアミノ酸が欠失、置換、又は付加されたアミノ酸配列からなりハイドロホー  
10 ビンと実質的に同等の機能を有するポリペプチド、を挙げることが出来る。

別の具体例として、以下の(a)又は(b)のDNA:

(a)配列番号:1、2又は3で示される塩基配列又はその部分配列を含むDNA、(b)(a)の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、(a)のDNAと実質的に同等の機能  
15 を有するDNA、を挙げることが出来る。

本発明で使用するアスペルギルス・オリゼ由来のプラスチック分解酵素遺伝子の具体例として、以下の(a)又は(b)ポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA:

20 (a)配列番号:4又は5で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチド、(b)(a)で示されるアミノ酸配列において、一部のアミノ酸が欠失、置換、又は付加されたアミノ酸配列からなりプラスチック分解酵素と実質的に同等の機能を有するポリペプチド、を挙げることが出来る。

別の具体例として、以下の(a)又は(b)のDNA:

25 (a)配列番号:4又は5で示される塩基配列又はその部分配列を含むDNA、(b)(a)の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、(a)のDNAと実質的に同等の機能を有するDNA、を挙げることが出来る。

本発明で使用するアスペルギルス・オリゼ由来のプラスチック結合性タンパク質遺伝子の具体例として、以下の(a)又は(b)ポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA:

- 5 (a)配列番号:6又は7で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチド、(b)(a)で示されるアミノ酸配列において、一部のアミノ酸が欠失、置換、又は付加されたアミノ酸配列からなりプラスチック結合性タンパク質と実質的に同等の機能を有するポリペプチド、を挙げることが出来る。

- 10 別の具体例として、以下の(a)又は(b)のDNA:

(a)配列番号:6又は7で示される塩基配列又はその部分配列を含むDNA、(b)(a)の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、(a)のDNAと実質的に同等の機能を有するDNA、を挙げることが出来る。

15

ここで、ポリペプチドの「機能」とは、それが細胞(菌体)の内部及び／又は外部において示す生物学的機能又は活性を意味する。更に、「実質的に同等」とは、それらの示す機能(活性)が程度の差はあるものの細胞(菌体)の内部及び／又は外部における機能として同等であると見做し得るものであることを示す。

20

本発明DNAは当業者に公知の方法で調製することが出来る。例えば、寄託されている菌株から実施例で記載した方法によって容易にクローニングすることが出来る。或は、本明細書に記載された本発明DNAの塩基配列又はアミノ酸産配列の情報に基づき、当業者に周知の化学合成、又は、本発明のプライマー

25 ーを使用したPCRにより増幅して調製することも出来る。

本明細書において、「ストリンジントな条件下」とは、各塩基配列間の相同性の程度が、例えば、全体の平均で約80%以上、好ましくは約90%以上、より

好ましくは約95%以上であるような、高い相同性を有する塩基配列間のみで、特異的にハイブリッドが形成されるような条件を意味する。具体的には、例えば、温度60℃～68℃において、ナトリウム濃度150～900mM、好ましくは600～900mM、pH 6～8であるような条件を挙げることが出来る。

5

ハイブリダイゼーションは、例えば、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー(Current protocols in molecular biology (edited by Frederick M. Ausubel et al., 1987))に記載の方法等、当業界で公知の方法あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する

10

本発明における特定のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とは、該アミノ酸配列と全アミノ酸配列に亘ってアラインメントして比較した場合に、全体の平均で80%以上、好ましくは90%以上、特に好ましくは99%以上のアミノ酸

15

又、本発明ポリペプチドにおける特定のアミノ酸配列において一部のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列とは、該アミノ酸配列から成るポリペプチドと実質的に同等の機能を有する限りにおいて、好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加したアミノ酸配列、或いはそれらを組み合わせたアミノ酸配列から成るものと意味する。又、ポリペプチドの「機能」とは、それが細胞(菌体)の内部及び

25

上記の特定のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列から成るポリペプチド、又はその一部のアミノ酸が欠失、置換又は付加したアミノ酸配列から成る

ポリペプチドは、例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法、及びPCR法等の当業者に周知の方法を適宜組み合わせ、容易に作成することが可能である。

- 5     尚、その際に、実質的に同等の機能を有するためには、当該ポリペプチドを構成するアミノ酸のうち、同族アミノ酸（極性・非極性アミノ酸、疎水性・親水性アミノ酸、陽性・陰性荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸など）同士の変換が可能と考えられる。又、実質的に同等の機能の維持のためには、本発明の各ポリペプチドに含まれる機能ドメイン内のアミノ酸は保持されることが望ましい。

10

- 本発明の各方法で有利に使用することができる微生物の好適例として既に記載した各種形質転換菌は、当該技術分野における周知の様々な技術及び手段を用いて、夫々のDNA又は遺伝子を含む組換えベクターを作成し、該組換えベクターで上記の糸状性細菌、真核糸状真菌、及びそれらの変異株等の  
15     宿主を、例えば、プロトプラストPEG法、エレクトロポレーション法、Tiープラスミド法、及びパーティクルガン等のような当業者に公知の組換え法によって得ることが出来る。

- 既に記載したように、これら形質転換菌においては各物質の生産誘導の抑制  
20     が解除されていることが望ましい。その為には、例えば、これらの物質をコードする遺伝子を構成的発現プロモーター又は各種の誘導型発現プロモーター等の制御下で発現させることができる。その結果、これら物質を高発現され、細胞表面又は菌体外に多量に生産されプラスチック分解が促進され、更に、有用物質の生産が促進される。

25

これらの各種プロモーターは当業者に公知である。例えば、アスペルギルス・オリゼ用の構成的発現プロモーターとしては、enoA プロモーター、pgkAプロモーター、及びtef1プロモーター等を挙げる事が出来る。又、アスペルギルス・オ

リゼ用の誘導型発現プロモーターとしては、マルトースを誘導基質とするグルコアミラーゼプロモーター又は $\alpha$ -アミラーゼプロモーター、及びキシロースを誘導基質とするキシラナーゼプロモーター等を挙げることが出来る。

## 5 実施例

以下に、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれ限定されるものではない。なお、実施例における各種遺伝子操作は、上記の Current protocols in molecular biology (edited by Frederick M. Ausubel et al., 1987) に記載されている方法に従った。

### 実施例 1

#### (1) 菌体プラスチック吸着因子 - ハイドロホービン遺伝子の取得

##### 15 (1-1) *A. oryzae* による生分解性プラスチック転換確認

##### [材料]

##### ① 試薬

特にことわりの無い限り、ナカライテスク(株)の特級試薬を用いた。生分解性プラスチックとしてポリブチレンサクシネート(PBS)を選択し、PBSエマルジョンは 20 昭和高分子(株)製のピオノーレエマルジョン OLX-07527 を用いた。試薬の調製はミリQ水を用いた。

##### ② 菌体

麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 を用いた。

##### ③ 培地

25 以下の表 1 に示した。

[表 1]

10 × stock solution (pH 6.5 ) ( /litter )			PBS emulsion minimal medium (1/litter)	
5	NaNO <sub>3</sub>	60 g	upper medium	
	KCl	5.2 g	10 × stock solution	100ml
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15.2 g	1000 × trace elements solution	1ml
	adjust to pH 6.5 with 10 N KOH		PBS emulsion liquid	10ml
			1M MgSO <sub>4</sub>	2ml
10			agarose	5g
1000 × trace elements solution ( /litter )			lower medium (1/litter)	
15	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0 g	10 × stock solution	100ml
	Zn · 7H <sub>2</sub> O	8.8 g	1000 × trace elements solution	1ml
	Cu · 5H <sub>2</sub> O	0.4 g	1M MgSO <sub>4</sub>	2ml
	Mn · 4H <sub>2</sub> O	0.15 g	agarose	15g
	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O	0.1 g	pour the medium on the lower medium	
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.05 g		
20				

## [方法]

- 炭素源をPBS に限定した最少寒天培地 (PBS emulsion minimal medium)に各種のアスペルギルス属糸状菌 (*A. oryzae*, *A. sojae*, *A. kawachii*, *A. awamori*, *A. niger*, *A. nidulans*) の孢子懸濁液を スポットし37℃で7日間培養した。同様にPBSを唯一の炭素源とした最少液体培地5mlに *A. oryzae* 孢子懸濁液を終濃度  $0.5 \times 10^5$  個/mlとなるよう植菌し、30℃で5日間振盪培養した。なお、液体培養は試験管で行なった。

## 【結果】

固体培養では*A. oryzae*, 及び *A. sojae*の場合に、夫々、約1.9cm及び約1.5cm幅のhaloが観察された(図1(A))。又、*A. nidulans*でもhaloが観察された。又、*A. oryzae*の液体培養でもPBSの濁度の顕著な低下が観察された(図1(B))。これらのことから、*A. oryzae* 等のアスペルギルス属糸状菌がPBS転換能力を持つことを確認された。

更に、生分解性プラスチックとしてPBSの代わりにポリ乳酸(PLA)を使用した各培養系において、*A. oryzae* によるプラスチックの分解を確認した。その結果を図2に示す。

## (1-2) DNAマイクロアレイを用いた発現遺伝子解析

## (1-2-1) 麹菌Total RNA の調製

## 15 【材料】

菌体からのTotal RNAの調製には、Sepasol-RNAISuper(ナカライテスク(株))を用いた。

## ②培地

培地の組成、DNAマイクロアレイ解析を行なう上での培養条件とその組み合わせを表2及び図3に示した。

【表2】

C source	Succinate	1,4-butanediol	PBS emulsion	PBS pellets
the quantity of C sources	10g	10ml	4.3ml	100g
the volume of cultures	150ml	150ml	450ml	1500ml
cultivating times	24h	24h	60h	120h



## [方法]

- 500 ml 容羽根付き三角フラスコ内のCzapek-Dox 培地150 ml に 終濃度が  $0.5 \times 10^7$  個/ml になるよう孢子懸濁液を植菌し、30℃で12時間培養した。菌体をミラクロス(CALBIOCHEM)で集菌し、滅菌水で洗浄後余分な水分を取り除いた。この回収した菌を、PBS固型ペレット、PBSエマルジョン、コハク酸、1,4-ブタンジオール を各々唯一の炭素源とした最少培地へと移し、30℃で振盪培養を行なった。培養時間はPBS pellets は120 時間、PBSエマルジョンは70 時間、コハク酸は12 時間、1,4-ブタンジオールは24 時間とした。培養終了後、PBS エマルジョン、コハク酸、1,4-ブタンジオール培地は、ミラクロスを用いて菌体を回収し、滅菌水で洗浄後余分な水分を取り除いた。PBS固型ペレットは、茶漉しを用いて菌体とPBS固型ペレットを分離した。得られた湿菌体の湿重量を計測した後、乳鉢中で液体窒素を注ぎながらパウダー状になるまで破碎した。湿重量の4倍量のSepasol-RNAISuper を入れた50 ml容チューブにパウダー状の菌体を移し、激しく攪拌後室温で5分間放置した。Sepasol-RNAISuperの 1/5量のクロロホルムを加え、よく攪拌した後、室温で3分放置した。10,000 × g、4℃で15分遠心した後、水層を15 ml容チューブに移し同量の水飽和酸性フェノール・クロロホルム(フェノール/クロロホルム = 1 / 1)を加え混合後、12,000 × g、4℃で10分遠心し水層を別の15 ml容チューブに移した。等量のイソプロパノールを加え室温で放置10分間放置後12,000 × g、4℃で10分遠心し、上清を捨て、10 mlの70%エタノールでリンスした。風乾後、適量のDEPC(diethylpirocarbonate)処理水に溶解させた。

## (1-2-2)mRNA の精製

## [材料]

- 25 mRNAの精製には、Message Maker(Gibco BRL)を用いた。

## [方法]

精製操作はMessage Maker 添付マニュアルに従った。以下、Total RNA量 1 mg を用いた時の手順を示した。

1 mg のtotal RNAを15 ml容チューブに1.8 mlにDEPC処理水を用いてフィルアップ(終濃度0.55 mg/ml)し、65°Cで5分間インキュベート後、氷上にて急冷した。5 M NaCl を200  $\mu$ l加え、よく攪拌後oligo(dT) Cellulose Suspension を1  
5 ml添加し、よく混合した後、37°Cで10分間インキュベートした。サンプルをシリンジに入れプランジャーで押し切った後、ディスポのカップに入れた3 mlのWash buffer 1 をシリンジで吸った。シリンジ中の液をよく懸濁し、液をプランジャーで押し切った。同様の操作を3 mlのWash buffer 2 で行なった。次に65°Cに保温しておいたDEPC処理水1 mlをシリンジで吸い上げ、よく懸濁後、15 mlチューブ  
10 に押し出した。再度、DEPC処理水1 mlで溶出した後、溶出液を合わせ、12,000  $\times g$ 、4°Cで3分間遠心し、oligo(dT) Cellulose Suspensionを取り除いた。この上清約2 mlに対し、5 mg/ml のグリコーゲン溶液を20  $\mu$ l、7.5 M 酢酸アンモニウム(pH 5.2)を200  $\mu$ l加えて混合し、エッペンドルチューブ5本に分注し、2倍量の氷冷エタノールを加え、-20°Cにて一晩エタノール沈殿を行なった。12,000  $\times g$ 、4  
15 °Cで30分間遠心した後、上清を捨て75%エタノールでリンスした、風乾後、適量のDEPC処理水に溶解させた。

### (1-2-3) mRNAのラベリング

#### [材料]

20 精製したmRNAの蛍光色素によるラベリングはCy3-dUTP、Cy5-dUTP (Amersham Biosciences)を用いた。

#### [方法]

エッペンドルフチューブに、mRNA 0.5~1.0  $\mu$ g、ランダムプライマー(9 mer)(2  $\mu$ g/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l、oligo(dT)primer (12-18mer)(0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l、DEPC処理水を加え10  $\mu$ lとした。70°Cで10分インキュベートした後、室温に10分放置し、その後氷  
25 上で5分間以上放置し、mRNAにプライマーをアニーリングさせた。次に、この反応液に5  $\times$  First Strand Buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3、375 mM KCl、15 mM MgCl<sub>2</sub>) 4  $\mu$ l、0.1 M DTT 2  $\mu$ l、50  $\times$  dNTPs (25 mM dATP, GTP, CTP、10

- mM TTP) 0.4  $\mu$ l、Cy-dye (3 or 5) 2  $\mu$ l、Super Script II RT (200 U/ $\mu$ l) 1.5  $\mu$ l を加えピペティングによる攪拌後42°Cで1時間インキュベートし逆転写反応させた。なお、この操作以降直接光が当たらないように注意して行なった。その後再びSuper Script II RT (200 U/ $\mu$ l) 1.5  $\mu$ l を加え攪拌し、42°C、1時間、70°C
- 5 ,10分、37°C、5分インキュベートした後、RNase H (10 U/ $\mu$ l) 0.3  $\mu$ l 加え、37°C ,15分、70°C、10分インキュベートし未反応mRNAを分解させた。専用のチューブに装着したMicrocon-30 のカップに各々の組み合わせ(図3)でCy3、Cy5でラベルした溶液を混合し、300  $\mu$ lのTE を加え、10,000  $g$  室温で20分間遠心濃縮した。再度400  $\mu$ lのTE を加え10,000  $\times g$  室温で20分間遠心濃縮した。次に
- 10 Human Cot1-DNA (1 mg/ml) 60  $\mu$ lとTE 300  $\mu$ l を加え、10,000  $\times g$  室温で30分間遠心濃縮した。Microcon-30 のカップを取り出し、新しいチューブに逆さに挿入し、3,000  $\times g$  室温で3分間遠心してカップ中の溶液を回収した。これをTE で28  $\mu$ l にフィルアップした後、yeast tRNA (10 mg/ml) 4  $\mu$ l、poly dA (1 mg / ml) 16  $\mu$ l、20  $\times$  SSC 10.2  $\mu$ l、10% SDS 1.8  $\mu$ l を加えた。この混合液60  $\mu$ l を
- 15 1分間煮沸し、室温に戻したものをを用いてハイブリダイゼーションを行なった。

#### (1-2-4) ハイブリダイゼーション、洗浄、検出

##### [材料]

- A. *oryzae* の2146個のESTクローンを搭載したcDNA マイクロアレイ(旭テクノ
- 20 ノグラス(株)製)を用いた。ギャップカバーグラス(25  $\times$  50 mm)はMATSUNAMI(株)製を用いた。ハイブリダイゼーションカセットはArray IT を用いた。また、スキヤナー解析はAxon 社製 Gene Pix 4000B microarray scanner にて、画像解析はAxon 社製 Gene Pix Pro 3.0 software package および Mesia Cybernetics 社製 Array Pro program を用いた。

25

##### [方法]

スライドグラスの上に遺伝子がスポットされた領域を囲むように、ギャップカバーグラスをのせ、端から上記で調製したラベル化溶液30  $\mu$ l を毛細現象により

流し込んだ。スライドガラスをハイブリダイゼーションカセットにセットし乾燥を防ぐためにカセット内の窪みに 30  $\mu$ l の精製水とガラス上のカバーガラスと離れた2点に5  $\mu$ l の3 $\times$ SSCを滴下した。ハイブリダイゼーションは55 $^{\circ}$ C 8時間 ゆるやかに振盪させながら行なった。ハイブリダイゼーション終了後、以下の操作でスライドガラスの洗浄を行なった。ハイブリダイゼーションカセットを外し、スライドガラスを2 $\times$ SSC / 0.1%SDS に浸して液中ですばやく滑り落とした。別に準備した2 $\times$ SSC / 0.1%SDS 中で5分間室温にて振盪した。続いて、40 $^{\circ}$ Cに保温してある0.2 $\times$ SSC / 0.1%SDS 中で5分間振盪した後、0.2 $\times$ SSC 中に3分間放置した。300 $\times$ g で1分間遠心し、スライドガラスの水分を除いた後、検出を行なった。コントロール(コハク酸)の発現量がサンプル(PBS 固型ペレット, PBS エマルジョン, 1,4-ブタンジオール)のそれよりも多い場合、DNAチップのスポットは緑色に発色する。発現量が同程度の場合は黄色に発色し、サンプルの発現量がコントロールより上回る場合は、赤色に発色する。よって、PBS存在時に特異的に発現している遺伝子はSu3PP5 とSu3PE5 で赤色に発色し、Su3Bu5 では発色がないものである(図4)。よって、Su3PP5 とSu3PE5 で赤色に発色している遺伝子群から、Su3Bu5で赤色に発色している遺伝子群を差し引き、PBS存在時に特異的に発現している遺伝子を検索した。なお、Su3PP5、Su3PE5、Su3Bu5全てに共通して発現するヒストンをコードする遺伝子を黄色、つまり、シグナル強度(Cy5 / Cy3)約1に設定した。

20

#### [結果]

Su3PP5、Su3PE5、Su3Bu5のDNAマイクロアレイの結果を視覚的に解析すると、JZ3981が、Su3PP5 とSu3PE5でのみ赤色に発色していた(図5)。尚、スポットの下に示された各数字は、遺伝子発現を(Cy5 / Cy3)の比で表わしている。ヒストンはコントロールである。このことから、JZ3981がPBS分解に関わる遺伝子であることが示された。次にこのクローンについて、*Aspergillus oryzae* ESTデータベース([www.aist.go.jp/ffdb/index.html](http://www.aist.go.jp/ffdb/index.html))に対するBLASTネットワークサービスを用いて、相同性の高いクローン情報を得た。

25

## (1-2-5) ESTデータベースを用いたJZ3981の探索

## [結果]

*A. oryzae* ESTデータベースに対してBLASTネットワークサービスを用いて、相  
5 同性の高いクローン情報を検索した。JZ3981 は *Emericella nidulans* の  
RODLET PROTEIN PRECURSOR に  $4e-57$ 、*Aspergillus fumigatus* の  
HYDROPHOBIN PRECURSOR に  $9e-57$  の相同性を示した。さらに、  
hydrophobin (ハイドロホービン) に保存されている8つのシステイン残基を含んで  
10 おり、このクローンは *A. oryzae* の hydrophobin (ハイドロホービン) 遺伝子 (*hyp*)  
であることが明らかとなった。

(1-3) 麹菌 *A. oryzae* ハイドロホービン遺伝子 (*hyp*) の単離

## (1-3-1) JZ3981の塩基配列の解析

ESTクローンJZ3981のEST情報は部分配列のみであったので、JZ3981の全  
15 塩基配列を決定した。

## [方法]

ABI PRISM 310 Genetic Analyzerを用いてシーケンシングを行なった。

	JZ3981	4 $\mu$ l
20	M 13 Universal primer (F or R)	4 $\mu$ l
	<u>Terminator Ready Reaction mix</u>	<u>8 <math>\mu</math>l</u>
	DDW	fill up to 20 $\mu$ l

上記のような反応系を作製し、TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL (宝  
25 酒造(株))にてPCR反応を行なった。PCR反応条件は 96°C 3分、96°C 10分  
、50°C 5分、60°C 4分を30cycleとした。PCR反応後、エタノール沈殿を行なった  
後、loading dye 15  $\mu$ l に溶解し3分間煮沸したのち、ABI PRISM 310 Genetic  
Analyzerに供し、ABI PRISM Sequencing Analysis version 3.0 で解析した。

[結果] JZ3981がハイドロホービンの完全長を含むことを確認した(図6)。

## 実施例2

### 5 (2) ハイドロホービン高発現麹菌の育種

#### (2-1) 麹菌用ハイドロホービン高発現プラスミドの構築

ハイドロホービン 高発現麹菌を育種するために、麹菌用ハイドロホービン高発現プラスミドを構築した。麹菌発現用ベクターであるpNGA142 系ベクターを用いた(「キノコとカビの基礎科学とバイオ技術」宍戸和夫・編著(アイピーシー) 10 p. 534)。また、ハイドロホービンの高発現には構成的プロモーターの存在が不可欠であるため、目的遺伝子上流に目的遺伝子(*hyp*)の上流に*enoA* promoter を融合させたpNG-*enoP*-*hyp*を作製した(図7)。

#### [材料]

##### 15 ①試薬

各種制限酵素、修飾酵素類は宝酒造(株)、Boehringer Mannheim 山之内(株)、New England Biolabs のものを適宜用いた。試薬を調製する際はミリQ水を用い、特に断りのない限り121℃、20分間オートクレーブ滅菌した。

##### ②菌株

20 大腸菌(*Escherichia coli*)はXL1-Blue(Stratagene社製)を用いた。麹菌は*A. oryzae* RIB40を用いた。

##### ③培地

用いた大腸菌用培地は、Stratagene社のXL1-Blue添付のマニュアルに従った。

##### 25 1-4-1) pNG-*enoP*-*hyp* の構築

#### [材料]

##### ④ベクター

ベクターとしては、*enoA* promoter を含むpNGEG-d1 (Toda T. et al., Curr.

Genet. 40:260-267, [2001])を使用した。インサートを含むJZ3981(pSPORT 1-hyp)は醸造研究所(現在の独立行政法人酒類総合研究所:広島県広島市鏡山3-7-1)から分譲を受けた。

## 5 「方法」

### ①制限酵素によるDNAの切断

pNGEG-d1、pSPORT 1-hyp各々をXbaIとSalIにより切断した。

### ②ベクターDNA、インサートDNAの調製

ベクターDNA、インサートDNAともに、制限酵素で完全に切断した後、アガロース  
10 ゲル電気泳動に供し、長波長(366nm)UV下でDNAフラグメントを切り出した。その後、prep A gene (Bio-Rad-Laboratories)にてDNAを回収し、ベクターDNA、インサートDNAとした。

### ③ライゲーション

ライゲーション反応は調整したベクターDNAとインサートDNA、さらにT4 DNA  
15 ligase (GIBCO BRL Lifetechnology)、5×ligation buffer (250 mM Tris-HCl; pH7.6、50mM MgCl<sub>2</sub>、5mM ATP、5 mM DTT、25%PEG-8000)、滅菌水で20 μlにし16°Cで16時間反応させた。

### ④大腸菌の形質転換

ライゲーション液10 μlに10 μlの10×KCM(1 M KCl、0.3 M CaCl<sub>2</sub>、0.5 M  
20 MgCl<sub>2</sub>)、7 μlの30%ポリエチレングリコール(#6000)、73 μlの滅菌水を加え、よく攪拌した。これを氷中でよく冷却した後、氷上解凍したコンピテントセルを100 μl加え穏やかに攪拌し、氷中で20分間、続いて室温で10分間放置した。これに、200 μlのLB液体培地を加え、終濃度100 μg/mlになるようにアンピシリンを添加したLB平板培地にまき、37°Cで一晩培養した。

### ⑤プラスミドDNAの調製

25 目的のプラスミドDNAを用いて形質転換した大腸菌の単一のコロニーを、終濃度100 μg/mlになるようにアンピシリンを添加した3 ml LB液体培地に植菌し、37°Cで一晩振盪培養した。1.5 mlの培養液を2 mlのエッペンドルフチューブ

に移して $15,000 \times g$ で1分間遠心分離し、沈殿を $100 \mu\text{l}$ の氷冷したTEG(25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 50 mM Glucose, pH 8.0)で懸濁し、これに $200 \mu\text{l}$ の0.2 N NaOH-1% SDSを加えて穏やかに攪拌した後、 $150 \mu\text{l}$ の3 M NaOAc pH 5.2を加えて混合した。これを $15,000 \times g$ で4℃で5分間遠心分離し上清を回収し $450 \mu\text{l}$ のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール(25:24:1)を加えて激しく攪拌した後、 $15,000 \times g$ 、室温で5分間遠心分離し上層を回収した。この溶液に-20℃で氷冷した $900 \mu\text{l}$ のエタノールを加えて-20℃で10分間放置後、 $15,000 \times g$ で4℃で5分間遠心分離した。沈殿を $500 \mu\text{l}$ の70%エタノールでリンスしたのち、乾燥させ、最後にRNaseH( $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ )を含むTE(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)  $50 \mu\text{l}$ に溶解した。得られたプラスミドを *Xba*Iと*Sa*Iで切断後、アガロース電気泳動により挿入断片の存在を認め、pNG-enoP-hypの完成を確認した。

#### (2-2) ハイドロホービン高発現麹菌の形質転換・育種

15 アスペルギルス・オリゼの形質転換はプロトプラスト-PEG法を改良した方法を用い、形質転換するプラスミドDNAは上記で作製したpNG-enoP-hyp, pNG-enoP(pNG-enoP-hypのハイドロホービン遺伝子インサート無しベクターのみ)を用いた。これらのプラスミドDNA  $10 \mu\text{g}$ を*Mun*Iで完全消化し、定法によりフェノール抽出、エタノール沈澱処理を行った後  $10 \mu\text{l}$ のTEに溶解し形質転換用DNA溶液とした。

20 アスペルギルス・オリゼ *niaD300* 株(RIB40株由来の硝酸還元酵素遺伝子(*niaD*)欠損変異株:醸造研究所より分与)の孢子懸濁液をYPD液体培地に添加し、30℃、12時間振盪培養した。培養液よりガラスフィルターを用いで集菌した。菌体を50ml容の遠心チューブに移し、10mlのプロトプラスト化溶液(0.6M KCl, 0.2M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 5.5, 5mg/ml Lysing enzyme(Sigma Chemical Co.), 25 10mg/ml Cellulase Onozuka R-10 (Yakult Pharmaceutical Ind.Co.,Ltd.), 10mg/ml Yatalase (TaKaRa)を加え懸濁し、30℃90rpm, 3時間振盪しプロトプラスト化反応を行った。滅菌したMIRACLOTH(CALBIOCHEM)にて濾過し、



濾液中のプロトプラストを  $3000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 5 分間遠心分離することで沈澱として得た。SolI(1.2M ソルビトール, 50mM  $\text{CaCl}_2$ , Tris-HCl buffer, pH7.5)にて 3 回プロトプラストを洗浄し、 $3000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 5 分間遠心分離することで沈澱として得た。このプロトプラストを  $1 \times 10^9$  個プロトプラスト/ml になるように SolI に懸濁した。プロトプラスト懸濁液 100  $\mu\text{l}$  に前述の形質転換用プラスミド DNA 溶液 各 10  $\mu\text{l}$  と 12.5  $\mu\text{l}$  の SolI (50(w/v%) PEG # 4000, 50mM  $\text{CaCl}_2$ , 10mM Tris-HCl buffer, pH7.5) を加えよく混合し、氷中で 30 分間放置した。次にこの混合液を 50ml 容の遠心チューブに移し、1ml の SolI を加え混合した後、2ml の 1.2M ソルビトール, 50mM  $\text{CaCl}_2$ , Tris-HCl buffer, pH7.5 を加えよく混合した。55 $^{\circ}\text{C}$  に温めておいた Czapek-Dox 軟寒天培地にプロトプラスト懸濁液を加え混合し、Czapek-Dox 寒天培地に重層した。その後、30 $^{\circ}\text{C}$  で胞子を形成するまで培養した。

胞子形成後、白金針にて分生子柄をかきとり、0.01%(v/v%) Tween80 に懸濁し、この懸濁液を希釈し、Czapek-Dox 寒天培地に広げ 30 $^{\circ}\text{C}$  で培養することを繰り返し単胞子分離をおこなった。単胞子分離の確認は Hondel 法(胞子 PCR 法)を改変しておこなった。白金針にて 200  $\mu\text{l}$  の YPD 培地が入った 1.5ml 容マイクロチューブに分生子を添加し、30 $^{\circ}\text{C}$  で 40 時間培養した。培養菌体を新しい 1.5ml 容マイクロチューブに移し、50  $\mu\text{l}$  のプロトプラスト化溶液 0.8M KCl, 10mM クエン酸, pH6.5, 2.5mg/ml Lysing enzyme (Sigma Chemical Co.), 2.5mg/ml Yatalase (TaKaRa) を加えて懸濁し、37 $^{\circ}\text{C}$  で一時間放置した後、95 $^{\circ}\text{C}$  で 3 分間加温し、次いで 5 分間以上氷上に放置し菌体を沈澱させた。この上清 5  $\mu\text{l}$  を鋳型として PCR の反応系に用いた。

pNG-enoP-hyp の胞子 PCR 用のプライマーとして  
5'-ATTCGCGAAAATGGTAGCTCGAGGA-3' と  
5'-GTAGAATCACGAATGAGACCTTTGACGACC-3' の 2 種のオリゴヌクレオチドを合成し、pNG-enoP のプライマーとして 5'-  
GTAGAATCACGAATGAGACCTTTGACGACC-3' と 5'-

- GTTAGTCGACTGACCAATTCCGCAG-3' の2種のオリゴヌクレオチドを合成した。PCR 用装置は PCR Thermal Cycler PERSONAL (宝酒造) を用いた。ポジティブコントロールとして形質転換に使用にしたプラスミド DNA を鋳型とした。pNG-enoP-hypの増幅反応は 95℃, 3 分間鋳型 DNA を変性し、94℃, 1 分間, 55.5℃, 1 分間, 72℃, 90 秒間保持するサイクルを 30 サイクルおこなった後、72℃, 95 秒間で完全伸長させ4℃ で保持した。pNG-enoPの増幅反応は95℃, 3 分間鋳型 DNA を変性し、94℃, 1 分間, 57℃, 1 分間, 72℃, 90 秒間保持するサイクルを 30 サイクルおこなった後、72℃, 95 秒間で完全伸長させ4℃ で保持した。得られた PCR 増幅断片をアガロース電気泳動に供したところ、ポジティブコントロールと同じ位置に PCR 断片の増幅が確認され、その結果より、麹菌の染色体 DNA 上にエノラーゼプロモーター配列下流にハイドロホービン遺伝子の挿入された配列の存在が確認され、pNG-enoPもまた形質転換されたことが確認された。
- 15 形質転換された ハイドロホービン 高発現麹菌とハイドロホービン遺伝子を挿入していない麹菌 (pNG-enoP) を 200ml のYPD 培地 (1(w/v%)酵母エキス, 2(w/v%) ペプトン, 2(w/v%) グルコース) に2500孢子/ml濃度で植菌し、30℃, 24 時間振盪培養しガラスフィルターで菌体を濾過し、培養上清を得た。培養上清 1ml に対して 500  $\mu$ l の 100 (w/v%) 冷トリクロロ酢酸を加え、よく混合した後、氷中に 12-16 時間放置した。サンプルを 15000  $\times$  g, 4℃, 20 分間遠心分離し上清を完全に除いた後、沈澱を 15  $\mu$ l のSDS化溶液 (0.063M Tris-HCl buffer, pH6.8, 2 (w/v%) SDS, 1(v/v%) 2-メルカプトエタノール, 10(w/v%) グリセロール, 0.05(w/v%) ブロモフェノールブルー)に溶解させたあと、沸騰湯浴中に5分間放置し SDS化をおこない、これをサンプルとした。以後の SDS-PAGE と PVDF膜へのブロッティングの方法は Schagger ら (Schagger, H., *et al.* (1987) *Anal. Biochem.*, 166, 368-379)の方法にしたがった。泳動板は、160mm  $\times$  160mm, 1mm 厚のものを使用し、電流 10mA 一定で泳動を開始しサンプルのグリセロール前線が泳動板の先端まで泳動したところ

で電気泳動を止めた。その後、電気泳動したゲルをPVDF膜に転写し、PVDF膜上より 14.3kDa の断片を切り抜き、そのままアミノ末端アミノ酸配列の解析をおこなった。解析の結果アミノ末端からLPPAS であり、麹菌ハイドロホービン EST クローンの塩基配列をアミノ酸置換したものと相同検索をしたところ一致したため培養上清に ハイドロホービンがあることが確認された。また PVDF 膜に転写すると同時に CBB 染色をしたところハイドロホービン遺伝子を挿入していない麹菌の培養上清からは、分子量14.3kDaにバンドが確認されなかったことから。ハイドロホービン高発現麹菌はその細胞表層のみならず高度にハイドロホービンを培養上清に分泌していることが確認された(図8)。

尚、プラスミドDNA(pNG-enoP-hyp)で形質転換された ハイドロホービン高発現麹菌は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1丁目1番地1)に平成14年10月4日付けで寄託され、受託番号:FERM P-19055を付与されている。

### 実施例3

#### (3)生分解性プラスチック分解酵素クチナーゼ遺伝子の取得とその高発現麹菌の育種

生分解性プラスチック分解因子として分解酵素があげられる。そこで、生分解性プラスチック分解酵素遺伝子を取得するとともに、その高発現麹菌株の育種を行った。生分解性プラスチックとしてはPBSを用いた。

#### (3-1)アスペルギルス・オリゼ由来 PBS (ポリブチレンサクシネート)分解酵素の精製

0.5 x 10<sup>6</sup> 個孢子/ml となるようにアスペルギルス・オリゼ RIB40 孢子懸濁液を 500 ml 容三角フラスコ内の 100 ml の 1 (v/v %) PBS 乳化液(昭和高分子)を含み、唯一の炭素源とした Czapek Dox 培地 (34  $\mu$ g/ml クロラムフ

エニコール)(Nakajima, K., *et al.* (2000) *Curr. Genet.*, 37, 322-327) に添加した。  
。添加後 30°C, 125 rpm, 5 日間培養した。培養液を MIRACLOTH  
(CALBIOCHEM(登録商標)) にて濾過し、その濾液を 8000 g, 4°C, 20 分間遠  
心分離し得られた上清を粗酵素液とした。粗酵素液に 20% 飽和となるように  
5 硫酸アンモニウムを加えた後、8000 g, 4°C, 20 分間遠心分離し得られた上清  
画分を得た。上清画分を 10 mM トリス-塩酸緩衝液, pH 8.0, 20 % 飽和硫酸  
アンモニウムにて平衡化した Octyl-Cellulofine(生化学工業)に供し、吸着画  
分を 20-0 % 飽和硫酸アンモニウムの直線濃度勾配による溶出させた。分画  
した溶液に対して 0.1 (v/v %) となるように PBS 乳化液を添加し、37°C にて  
10 保温し、その濁度の低下(PBS の分解)によって活性画分を追跡した。得られ  
た活性画分を10 mM トリス-塩酸緩衝液, pH 8.0 に対して透析し、同緩衝液に  
て平衡化した DEAE-TOYOPEARL 650S カラム(東ソー)に供し、吸着画分を  
0-0.3 M NaCl の直線濃度勾配により溶出させた。得られた活性画分を 10mM  
MES 緩衝液, pH 5.5 に対して透析し、同緩衝液にて平衡化した HiTrap SP  
15 カラム(アマシャムファルマシア バイオテック)に供し、吸着画分を0-0.3 M NaCl  
の直線濃度勾配により溶出させた。得られた活性画分を SDS-PAGE  
(Laemmli, U. K. (1970) *Nature*, 227, 680-685) に供し電気泳動的に均一であ  
ることが確認されたため、ここで得られた活性画分を PBS 分解酵素精製標品  
とした。

20

### (3-2) PBS 分解酵素の内部アミノ酸配列の決定

上記で得られた精製酵素溶液 (0.4 mg/ml) 250  $\mu$ l に対して 200  $\mu$ l の  
100 (w/v %) 冷トリクロロ酢酸を加え、よく混合した後、氷中に 12-16 時間放  
置した。サンプルを 15000 g, 4°C, 20 分間遠心分離し、上清を完全に除いた  
25 後、沈殿を 50  $\mu$ l の SDS 化溶液 {0.063 M トリス-塩酸緩衝液, pH 6.8, 2  
(w/v %) SDS, 1 (v/v %) 2-メルカプトエタノール, 10 (w/v %) グリセロール} に溶  
解させた後、沸騰湯浴中に 5 分間放置し SDS 化をおこない、これをサンプル  
溶液とした。別に V8 プロテアーゼ溶液 {6.3  $\mu$ g のV8 プロテアーゼを 25  $\mu$ l

の 0.05 (w/v %) ブロモフェノールブルー, 0.019 M トリス-塩酸緩衝液, pH 6.8, 0.6 (w/v %) SDS, 0.3 (v/v %) 2-メルカプトエタノール, 3 (w/v %) グリセロールに溶解させたもの} を調製した。以後の SDS-PAGE と PVDF 膜へのブロッティングの方法は Schagger らの方法 (Schagger, H., *et al.* (1987) *Anal.*

- 5 *Biochem.*, 166, 368-379) に従った。160 mm x 160 mm, 1 mm 厚の泳動板を使用した。50  $\mu$ l のサンプル溶液をウェルにアプライし、さらに 25  $\mu$ l の V8 プロテアーゼ溶液を重層した。電流 15 mA 一定で泳動を開始し、色素(ブロモフェノールブルー)が濃縮ゲルのほぼ中間まで泳動された時点で泳動を停止し、そのまま室温にて 1 時間放置し、ゲル内での V8 プロテアーゼによる限定分
- 10 解をおこなった。その後電気泳動を再開し、泳動後ゲル内のタンパク質を PVDF 膜に転写した。PVDF 膜上より 7.9 kDa、10.3 kDa、11.9 kDa の断片を切り抜き、そのままアミノ末端アミノ酸配列の解析をおこなった (Matsudaira, P. (1987) *J. Biol. Chem.*, 262, 10035-10038)。10.3 kDa、11.9 kDa のアミノ末端アミノ酸配列を解析した結果、両者共にアミノ末端側より、AQGLFEQAVS、であ
- 15 った。得られたアミノ酸配列に対して National Center for Biotechnology Information (NCBI ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) の BLAST 検索 (Zhang, J., *et al.* (1997) *Genome Res.*, 7, 649-656) を利用して相同検索をおこなったところ、アスペルギルス・オリゼの産生するクチナーゼの内部アミノ酸配列と一致した (Ohnishi, K., *et al.* (1995) *FEMS Microbiol. Lett.*, 126 (2), 145-150)。

20

### (3-3) PBS 分解酵素遺伝子を含む染色体 DNA のクローニング

- PBS 分解酵素遺伝子を含む染色体 DNA を取得するために、アスペルギルス・オリゼの菌系より染色体 DNA を調製した。0.5  $\times$  10<sup>6</sup> 個胞子/ml となるようにアスペルギルス・オリゼ RIB40 胞子懸濁液を 500 ml 容三角フラスコ内
- 25 の 100 ml の YPD 液体培地 {1 (w/v %) 酵母エキス, 2 (w/v %) ペプトン, 2 (w/v %) グルコース} に添加した。添加後 30°C, 125 rpm, 16 時間培養した。培養液をガラスフィルターで濾過し菌系を集め、蒸留水で洗浄した。菌系を脱水した後、予め -20°C に冷やしておいた乳鉢に菌体を入れ、液体窒素を注い

で凍結させ、直ちに冷やした乳棒で細かく粉碎した。粉碎した菌糸をスパーテルで1.5 ml 容マイクロチューブにとり、0.4 ml の TE (10 mM トリス-塩酸緩衝液, pH 8.0, 1 mM EDTA) に懸濁した後、溶菌溶液 [2 (w/v %) SDS, 0.1 M NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM トリス-塩酸緩衝液, pH 7.0] を 0.4 ml 加えてゆっくり攪拌し、室温に 15 分間放置した。15,000 × g, 10 分間遠心分離して上清を新しい1.5 ml 容マイクロチューブに回収した。フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1) を等量加え、ゆっくりチューブを上下に攪拌した後、15000 g, 5 分間遠心分離して上清を新しい1.5 ml 容マイクロチューブに回収した。-20°C に冷やしたエタノールを 2.5 倍量加えて、-20°Cに 10 分間放置した後、15,000 × g, 4°C, 15 分間遠心分離し上清を完全に除き沈殿を得た。沈殿を0.5 ml の TE に溶解させ、5 μl の RNase A (10 mg/ml) 溶液を加え、37°C に 30 分間放置し RNA を分解した。0.5 ml のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1) を加え、ゆっくりチューブを上下に攪拌した後、15,000 × g, 5 分間遠心分離して上清を新しい1.5 ml 容マイクロチューブに回収した。この操作をもう 1 回繰り返した。0.5 ml のクロロホルム・イソアミルアルコール (24:1) を加え、ゆっくりチューブを上下に攪拌した後、15,000 × g, 5 分間遠心分離して上清を新しい1.5 ml 容マイクロチューブに回収した。50 μl の 5 M NaCl と 1 ml の冷エタノールを加え、-20°Cに 10 分間放置した後、15,000 × g, 4°C, 15 分間遠心分離し上清を完全に除き沈殿を得た。70 (v/v %) エタノールで DNA を洗浄して 15,000 × g, 4°C, 10 分間遠心分離し上清を完全に除き沈殿を得た。沈殿を 0.1 ml の TE で溶解し、これを染色体 DNA 溶液とした。

次に、前述の内部アミノ酸配列をもとに、30 塩基からなるオリゴヌクレオチド (5'-GCACAAGGACTGTTTGAACAAGCTGTTTCC-3') と、既知のクチナーゼ遺伝子塩基配列を基に、30 塩基からなるオリゴヌクレオチド (5'-CCAGGCAGACAAGATCTCCCACGGCGCAAT-3') を合成した。この 1 組のプライマーセットを用い、染色体 DNA を鋳型として PCR をおこないサザンハイブリダイゼーションのプロープを増幅した。PCR 用装置は PCR Thermal

Cycler PERSONAL(宝酒造)を用いた。染色体 DNA は 100 ng 用い、ポリメ  
ラーゼは Ex taq polymerase(宝酒造)を用いた。増幅反応は、95°C, 3 分間鑄  
型 DNA を変性し、95°C, 1 分間、60°C, 1 分間、72°C, 30 秒間保持するサイ  
クルを 30 サイクルおこなった後、72°C, 1 分間で完全伸長させ、4°Cで保持し  
5 た。得られた PCR 増幅断片をアガロースゲル電気泳動に供したところ、300  
塩基対からなる断片の増幅が確認された。

次に、NEN RandomPrimer Fluorescein Labeling Kit with  
Antifluorescein-AP (Eizo Diagnostics, Inc.) を用いてサザンハイブリダイゼー  
10 ションとコロニーハイブリダイゼーションをおこなった。また今後使用した SSC 液  
は 20 倍濃度 (20x SSC)(175.4 g NaCl と 88.2 g Sodium Citrate Dihydrate  
を水に溶解し、1 l に合わせた後、オートクレーブ滅菌したもの)を適宜滅菌水で  
希釈し調製したものを用いた。染色体 DNA 10  $\mu$ g を 50 ユニットの *EcoR* V  
(宝酒造)で完全消化しアガロースゲル電気泳動に供した。トレイにアルカリトラ  
15 ンスファー緩衝液 (0.4 N NaOH) を入れ、ガラス板をのせ、緩衝液に届くまでの  
長さに予め切った濾紙 (ADVANTEC TOYO)をのせて緩衝液で湿らせた。この  
上に泳動後のゲルをのせ、同じ大きさに切ったナイロンメンブラン (Hybond-N+;  
アマシャムファルマシア バイオテック)をゲル上に置き、さらにその上に滅菌水で  
湿らせた濾紙を 3 枚のせた。ペーパータオルを 5 cm の高さに積み重ね、重り  
20 をのせた。12 時間ブロッティングしたあと、メンブランを 4x SSC で洗浄し、ハイ  
ブリダイゼーションをおこなった。

次に、前述の PCR 反応液に対して 1/10 量の 5 M NaCl を加えさらに 2.5  
倍量の冷エタノールを加え、-20°Cに 10 分間放置した後、15,000  $\times g$ , 4°C, 15  
25 分間遠心分離し上清を完全に除き沈殿を得た。70 (v/v %) エタノールで DNA  
を洗浄して 15,000  $\times g$ , 4°C, 10 分間遠心分離し上清を完全に除き沈殿を得た。  
。沈殿を 1  $\mu$ g/ $\mu$ l となるように TE に溶解した。この DNA 溶液 20  $\mu$ l と  
NEN Random Primer Fluorescein Labeling Kit with Antifluorescein-AP の

Random Primers and Reaction Buffer Mix 5  $\mu$ l、Fluorescein Nucleotide Mix 5  $\mu$ l、Klenow Fragment 1  $\mu$ l を加え、ピペッティングにより混合し、37°Cで 1 時間反応させた。反応後、0.1 M EDTA, pH 8.0 を 5  $\mu$ l 加え、20 ng/ml となるように hybridization buffer {2 $\times$  SSC, 0.1 (w/v %) SDS, 5 (w/v %) Dextran Sulphate, 0.5 (v/v %) Blocking Reagent} と混合したものをプローブ溶液とした。

次にプロット後のメンブランを 2 $\times$  SSC でリンスし、ハイブリダイゼーションバッグに移し、0.1 ml/cm<sup>2</sup> となるように hybridization buffer と終濃度 50  $\mu$ g/ml となるように Carrier DNA を加え、60°Cで 1 時間保温した。続いて 200  $\mu$ l の hybridization buffer とプローブ溶液 20  $\mu$ l、Carrier DNA (10 mg/ml) 35  $\mu$ l をマイクロチューブ中で混合し、100°Cで 5 分間煮沸した。氷中で急冷しそのまま 5 分間放置した。これを予め 60°C に温めておき、ハイブリダイゼーションバッグ中の溶液と交換し、60°Cで 16 時間保温した。メンブランをハイブリダイゼーションバッグより取り出し、1 cm<sup>2</sup> のメンブランあたり 1 ml 以上の 2 $\times$  SSC, 1 (w/v %) SDS で60°C, 15 分間激しく振盪することによって洗浄し、次に 0.2 $\times$  SSC, 0.1 (w/v %) SDS で 60°C, 15 分間同様に洗浄した。以後の操作は室温でおこなった。1 cm<sup>2</sup> のメンブランあたり 1 ml 以上の 0.1 M トリス-塩酸緩衝液, pH 7.5, 0.15 M NaCl 中で激しく 5 分間振盪することで洗浄した。

次にプラスチックバッグ内の 1 cm<sup>2</sup> のメンブランあたり 0.1 ml 以上の 0.1 M トリス-塩酸緩衝液, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.5 (v/v %) Blocking Reagent 中で 1 時間振盪した。次にプラスチックバッグ内の 1 cm<sup>2</sup> のメンブランあたり 0.1 ml 以上の 0.1 M トリス-塩酸緩衝液, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.5 (v/v %) Blocking Reagent, 1/1000 (v/v) Antifluorescein-AP Conjugate との混合液中で 1 時間振盪した。その後メンブランを取り出し0.1 M トリス-塩酸緩衝液, pH 7.5, 0.15 M NaCl 中で 5 分間ずつ 4 回激しく振盪することで洗浄した。0.1 M トリス-塩酸緩衝液, pH 9.5, 0.1 M NaCl 中で 5 分間ずつ 2 回激しく振盪することで洗浄した。メンブランをプラスチックバッグに移し、これに ECF substrate



Auto Phos (Eizo Diagnostics, Inc.) を 1 ml 加え、遮光下で 30 分間反応させた。メンブランをプラスチックバッグから取り出しさらに 4 時間遮光下で放置した後、蛍光分析機 (FLA-2000; FUJIFILM) にて解析した。その結果約 1300 塩基対からなる強くハイブリダイズするバンドが検出された。

5

次に、染色体 DNA 10  $\mu$ g を 50 ユニットの *EcoR* V で完全消化しアガロースゲル電気泳動に供しエチジウムブロマイドで染色後、1300 塩基対付近のゲルを UV 照射下で切り出した。ゲル中より prep A gene (BioRad) を用いて DNA を抽出し、これを挿入 DNA 断片とした。

10

次にプラスミド pBluescript II KS+ DNA (Stratagene) 2.5  $\mu$ g を *EcoR* V (宝酒造) にて消化し、定法によりフェノール抽出、エタノール沈殿処理をおこなった後、アルカリフォスファターゼ (宝酒造) により 5' 末端のリン酸を除去した。この反応液を定法によりフェノール抽出、エタノール沈殿処理をおこなった後 TE に溶解したものをベクター DNA 溶液とした。

15

次に、ベクター DNA 1  $\mu$ g と挿入 DNA 断片 1.5  $\mu$ g を T4 DNA ligase (宝酒造) により連結させ、連結 DNA 溶液を得た。この連結 DNA 溶液 10  $\mu$ l と 10  $\mu$ l の 10x KCM (1 M KCl, 0.3 M CaCl<sub>2</sub>, 0.5 M MgCl<sub>2</sub>)、7  $\mu$ l の 30 (w/v %) PEG#6000、73  $\mu$ l の滅菌水を混合し、100  $\mu$ l の形質転換可能な大腸菌 DH5 $\alpha$  (宝酒造) を加え、氷中に 20 分間、室温に 10 分間放置し形質転換大腸菌懸濁液を得た。ナイロンメンブラン (Hybond-N+; アマシャムファルマシア バイオテック) を 50  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含む LB 寒天培地上に置き、その上に形質転換大腸菌懸濁液をまき、37°C で 16 時間培養した。メンブランを培地上より剥がし取りメンブランを 10 (w/v %) SDS に 3 分間、0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl に 10 分間浸し、溶液を除いた後、1 M トリス-塩酸緩衝液, pH 8.0, 1.5 M NaCl に浸し、溶液を除いた後、2x SSC で洗浄した。メンブランを 0.4 N NaOH に 1 時間浸し 2x SSC で洗浄した。このメンブランを前述の

20

25

サザンハイブリダイゼーションの時と同様の操作をおこない、プローブをハイブリダイズした。その結果ポジティブシグナルを得た。

- 次に、元の寒天培地上からポジティブシグナルとなるプラスミド DNA を有する
- 5 大腸菌を白金針にて拾い、LB 液体培地 (50  $\mu\text{g/ml}$  アンピシリン) に移植し 37°C にて 16 時間振盪培養した。培養液 1.5 ml を 1.5 ml 容マイクロチューブに移し、15,000  $\times g$ , 1 分間遠心分離し培地を除いた。菌体を 100  $\mu\text{l}$  の TEG (25 mM トリス-塩酸緩衝液, pH 8.0, 10 mM EDTA, 50 mM グルコース) で懸濁し、これに 200  $\mu\text{l}$  の 1 (w/v %) SDS, 0.2 N NaOH を加え穏やかに混
- 10 合し氷中に 5 分間放置した。さらに 150  $\mu\text{l}$  の 3 M 酢酸ナトリウム, pH 5.2 を加え穏やかに混合し氷中に 5 分間放置した。これに 10 M 酢酸アンモニウムを 150  $\mu\text{l}$  加え穏やかに混合し、15,000  $\times g$ , 4°C, 10 分間遠心分離し上清を新しい 1.5 ml 容マイクロチューブに移した。これに 600  $\mu\text{l}$  の 2-プロパノールを加え、よく混合した後 15,000  $\times g$ , 4°C, 10 分間遠心分離し上清を除いた。
- 15 70 (v/v %) エタノールで DNA を洗浄して 15,000  $\times g$ , 4°C, 10 分間遠心分離し上清を完全に除き沈殿を得た。沈殿を 0.1 ml の TE で溶解し、これをプラスミド DNA 溶液とした。このプラスミド DNA 中の挿入 DNA 断片の塩基配列を ABI PRISM™ 377 DNA sequencer Long Read (PE Biosystem) のプロトコールに従い、ABI PRISM™ 377 DNA sequencing system (PE Biosystem) にて解
- 20 析した。その結果、プラスミド DNA に挿入された 1334 塩基対からなる染色体 DNA の *EcoRV* 消化断片には、プローブの塩基配列を含むオープンリーディングフレームが見出された。このオープンリーディングフレームは 3 箇所のイントロン塩基配列を含み、さらに開始メチオニンをコードする塩基配列 ATG とストップコドンを含み、すなわち PBS 分解酵素遺伝子の全長を有していた(Ohnish
- 25 K. *et al.* (1995) *FEMS Microbiol Lett.*, 126(2), 145-150)。

#### (3-4) PBS 分解酵素高発現系の構築

前述の PBS 分解酵素遺伝子全長を有するプラスミド DNA 5  $\mu\text{g}$  を

*EcoRV* (宝酒造)にて消化し、アガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロマイドで染色後 UV 照射下で 1334 塩基対からなる断片を切り出した。ゲル中より prep A gene (BioRad) を用いて DNA を抽出し、これを挿入 DNA 断片とした。次に塩基配列中にグルコアミラーゼのプロモーター配列 (PglA 142) を有するプラスミド pNGA142 DNA 5  $\mu$ g をプロモーター配列の直後にある制限酵素 *PmaC* I 認識配列の位置で *PmaC* I (宝酒造)で消化し、定法によりフェノール抽出、エタノール沈殿処理をおこなった後、アルカリフォスファターゼ (宝酒造)により 5' 末端のリン酸を除去した。この反応液を定法によりフェノール抽出、エタノール沈殿処理をおこなった後 TE に溶解したものをベクター DNA 溶液とした。次に、ベクター DNA 1  $\mu$ g と挿入 DNA 断片 1.5  $\mu$ g を T4 DNA ligase (宝酒造)により連結させ、連結 DNA 溶液を得た。この連結 DNA 溶液 10  $\mu$ l と 10  $\mu$ l の 10 $\times$ KCM (1 M KCl, 0.3 M CaCl<sub>2</sub>, 0.5 M MgCl<sub>2</sub>)、7  $\mu$ l の 30 (w/v %) PEG#6000、73  $\mu$ lの滅菌水を混合し、100  $\mu$ l の形質転換可能な大腸菌 DH5 $\alpha$  (宝酒造)を加え、氷中に 20 分間、室温に 10 分間放置し形質転換大腸菌懸濁液を得た。次に 50  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含む LB 寒天培地上に形質転換大腸菌懸濁液をまき、37 $^{\circ}$ Cで 16 時間培養した。培地上のコロニーを白金針にて拾い、LB 液体培地 (50  $\mu$ g/ml アンピシリン)に移植し 37 $^{\circ}$ Cにて 16 時間振盪培養した。培養菌体中より前述と同様にプラスミド DNA を抽出し、この麹菌形質転換用プラスミド DNA (pNG-cut) を得た。このプラスミド DNA 10  $\mu$ g を *Mun* I で消化し、定法によりフェノール抽出、エタノール沈殿処理をおこなった後 10  $\mu$ l の TE に溶解し形質転換用 DNA 溶液とした。アスペルギルス・オリゼの形質転換は Vollmer らのプロトプラスト-PEG 法 (Vollmer, S. J., et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 4869-4873)を改良して行った。詳細は実施例 2(2-2)に従った。

25

形質転換再生培地で孢子形成後、白金針にて分生子柄をかきとり、0.01 (v/v %) Tween 80 に懸濁し、この懸濁液を適宜希釈し、Czapek-Dox 寒天培地に広げ 30 $^{\circ}$ C で培養することを繰り返すことで単孢子分離をおこなった。単

胞子分離の確認は Hondel 法(胞子 PCR 法)(van, Zeiji, C. M., *et al.* (1997) *J. Biotechnol.*, Jan 3; 59 (3), 221-224) を改変しておこなった。単胞子分離の詳細は実施例 2(2-2)記載の方法に従った。胞子 PCR 用プライマーとして、2 種のオリゴヌクレオチド (5'-TGCA GTGGCGGATCCGGTGGAC-3',  
5'-G TAGAATCACGAATGGAGCCTTTGACGACC-3') を合成した。PCR 用装置は PCR Thermal Cycler PERSONAL(宝酒造)を用いた。ポジティブコントロールとして麴菌形質転換用プラスミド DNA を鋳型とした。ポリメラーゼは Ex Taq polymerase(宝酒造)を用いた。増幅反応は、94℃, 3 分間鋳型 DNA を変性し、94℃, 1 分間、55.5℃, 1 分間、72℃, 90 秒間保持するサイクルを 30  
サイクルおこなった後、72℃, 95 秒間で完全伸長させ、4℃で保持した。得られた PCR 増幅断片をアガロースゲル電気泳動に供したところ、ポジティブコントロールと同じ位置に PCR 断片の増幅が確認され、その結果より染色体 DNA 上にグルコアミラーゼ・プロモーター配列の下流に PBS 分解酵素遺伝子が連結した塩基配列が挿入されたことと、それを有するアスペルギルス・オリゼ形質転換株が得られたことが確認された。この PBS 分解酵素遺伝子が染色体 DNA 中に挿入されたアスペルギルス・オリゼ形質転換株と、挿入されていない(pNGA142 にて形質転換した)アスペルギルス・オリゼ形質転換株の胞子懸濁液を  $0.5 \times 10^8$  個胞子/ml となるようにグルコアミラーゼ・プロモーターの誘導物質であるマルトースを含む 100 ml の YPM 液体培地 [1 (w/v %) 酵母エキス, 2 (w/v %) ペプトン, 2 (w/v %) マルトース] にそれぞれ添加した。添加後 30℃, 125 rpm, 16 時間培養し、培養上清を MIRACLOTH (CALBIOCHEM(登録商標)) にて濾過することで得た。得られた培養上清に対して 0.1 (v/v %) となるように PBS 乳化液を添加し、37℃ にて保温し、その濁度の低下(PBS の分解)によって PBS 分解酵素の発現を確認したところ、PBS 分解酵素遺伝子が染色体 DNA 中に挿入されたアスペルギルス・オリゼ形質転換株の培養上清中にのみその活性の存在が認められた。次に培養上清 100  $\mu$ l に 50  $\mu$ l の冷トリクロロ酢酸を加えよく混合した後、氷中で 20 分間放置し、15,000  $\times g$ , 4℃, 15 分間遠心分離し上清を完全に除き、沈殿画分を得た。これに 15  $\mu$ l

の SDS 化溶液 {0.063 M トリス-塩酸緩衝液, pH 6.8, 2 (w/v %) SDS, 1 (v/v %) 2-メルカプトエタノール, 10 (w/v %) グリセロール, 0.05 (w/v %) ブロモフェノールブルー} を加え溶解させた後、沸騰湯浴中にて 5 分間放置し SDS 化をおこなった。これを前述の PBS 分解酵素精製標品と共に SDS-PAGE に供したところ、PBS 分解酵素遺伝子が染色体 DNA 中に挿入されたアスペルギルス・オリゼ形質転換株の培養上清中にのみ PBS 分解酵素精製標品と同じ位置にタンパク質の発現が確認された(図9)。

尚、プラスミド DNA(pNG-cut)で形質転換された生分解性プラスチック分解酵素クチナーゼ遺伝子の高発現麹菌は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1丁目1番地1)に平成14年10月4日付けで寄託され、受託番号:FERM P-19054を付与されている。

#### 実施例4

15

(4) 麹菌アスペルギルス・オリゼ ハイドロホービン高発現菌、クチナーゼ高発現菌の単独培養、及び、これらの共培養によるプラスチック分解試験(液体培養系)

ハイドロホービン高発現麹菌(pNG-enoP-hyp)単独、クチナーゼ高発現麹菌(pNG-cut)単独、コントロールとして宿主であるRIB40株にベクターのみを導入した株(pNGA142)を実施例1記載のCzapek-Dox最少培地にPBS乳化液0.2%, 誘導基質としてマルトース 0.5%を加えた培地に胞子を $1 \times 10^6$ /mlで添加し30℃で2日間振盪培養した。さらにハイドロホービン高発現株とクチナーゼ高発現麹菌の共培養した試験区(pNG-cut+pNGenoP-hyp)も設けた。培養2日目の培養液をMIRACLOTHでろ過して菌体を除き、培養ろ液の濁度(630nmで測定)の低下を表3に示した。尚、初発の濁度( $OD_{630}$ )は8.73であった。その結果、共培養株>クチナーゼ発現株>ハイドロホービン発現株>コントロールの順序で濁度低下が大きかった。

[表3]

	Strain	残存乳化PBS 濁度 (OD <sub>630</sub> )
5	Control (pNGA142 )	4.99
	pNG-cut+pNG-enoP-hyp	1.53
	pNG-cut	3.26
	pNG-enoP-hyp	4.16

## 10 実施例5

(5) 麹菌アスペルギルス・オリゼ ハイドロホービン高発現菌、クチナーゼ高発現菌の単独培養、及び、これらの共培養によるプラスチック分解試験(固体培養系)

- 15 実施例4で用いたそれぞれの菌株を $1 \times 10^7$ 孢子個/mlに調整し、0.5%(w/v)のPBS粉末を懸濁した最小培地(0.5%マルトース)に接種して、30℃で8日間培養した。培養後、菌体を取り込んでいる PBS微細粉末を洗浄(菌体を50mlファルコンチューブに取り25ml程度の滅菌水を加えボルテックスミキサーで攪拌)し、菌体とPBS微細粉末を完全に分離した。洗浄液をミラクロスろ紙で濾過し、
- 20 濾液を遠心(10,000rpm15min)後、上清を除き初期培養条件の液量になるように最小培地で調整し懸濁させた。その懸濁液を300倍希釈し630nmで吸光度を測定した。得られた結果を表4に示す。

- これらの結果から、ハイドロホービン高発現株、クチナーゼ高発現株共に、宿主のRIB40株に比較して、粉体の固形PBSにおける生育も著しく増加し、PBSの
- 25 転換能が向上していることが確認された。

[表 4]

Strain	残存固体PBS 濁度 (OD <sub>680</sub> )	分解率
Control(pNGA142)	0.893	77%
pNG-eno-hyp	0.717	26%
pNG-cut	0.519	46%
pNG-cut+pNG-eno-hyp	0.243	75%

## 実施例 6

- 10 (6) 麹菌アスペルギルス・オリゼ ハイドロホービン高発現菌、クチナーゼ高発現菌、及び、有用物質の生合成系に関与する酵素(有用物質)を高発現菌の共培養による有用物質の製造

次いで生分解性プラスチックPBSの分解に共役した、有用物質生産の例として工業用酵素  $\alpha$ -アミラーゼの生産を行った。実施例4と同様の培地を用いて、  
 15 クチナーゼ高発現株(pNG-cut組み換え体)とハイドロホービン高発現株(pNG-enoP-hyp)の共培養、クチナーゼ高発現株(pNG-cut組み換え体)とハイドロホービン高発現株(pNG-enoP-hyp)と  $\alpha$ -アミラーゼ高発現株(pNG-amy)の共培養を行った。コントロールとしてpNGA142のインサートを持たないベクターのみを有するRIB40株を用いた。pNG-amyを保持するRIB40形質転換体は、麹菌  
 20  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子(S. Tada et al.: Agric. Biol. Chem., 53, 593-599 [1989])をクチナーゼ遺伝子同様にpNGA142に挿入して作製し、RIB40株を形質転換して得た。実施例4の実験と同様に、培地に  $1 \times 10^6$  個の孢子を接種し、30°Cで2日間培養した。培養液をMIRACLOTHでろ過して菌体を除き、培養ろ液を得、  
 25  $15000 \times g$ , 4°C, 10 分間遠心分離し残存する PBS を完全に除き培養上清を得た。

$\alpha$ -アミラーゼ活性の測定は、培養上清を水にて 100 倍に希釈したものを用いた。各培養上清中の  $\alpha$ -アミラーゼ活性発現量はヨウ素呈色法にて測定した

。測定用試薬溶液として、A 液; 50 mM トリス緩衝液 (pH 6.8) 中に可溶性澱粉を 0.3 % となるように溶かしたもの、B 液; 1 N 塩酸中にヨウ素を  $2 \times 10^{-4}$  %、ヨウ化カリウムを  $2 \times 10^{-3}$  % になるように溶かしたものを調製した。A 液 400  $\mu$ l に 50  $\mu$ l の希釈した培養上清を加え 37°C で 10 分間反応させた。そこに B 液を 50  $\mu$ l 加え、よく混合し、直ちに 620 nm の吸光度を測定し、Blank (未接種) の値に比した吸光度の減少量を  $\alpha$ -アミラーゼの相対活性量として表 5 に示した。PBS 減少量は三重共培養株 = 二重共培養株 > コントロールの順序で大きかった。 $\alpha$ -アミラーゼ活性誘導は三重共培養株 > 二重共培養株 > コントロールの順序で大きく、PBS 分解で供給される PBS モノマーをエネルギー源として、三重共培養区では工業用  $\alpha$ -アミラーゼ生産されることが明らかになった。

[表 5]

	Strain	残存PBS濁度 (OD <sub>630</sub> )	$\alpha$ -amylase 相対活性 ( $\Delta$ OD <sub>620</sub> )
15	Blank (未接種)	10.44	0
	Control (pNGA142)	3.18	0
	pNG-cut+pNG-enoP-hyp	0.47	0.020
	pNG-cut+pNG-enoP-hyp+pNG-amy	0.36	0.134

## 20 実施例 7

### (7) クチナーゼ-ハイドロホービン共高発現株の育種

実施例 3-4 で得られたクチナーゼ高発現株を用いてクチナーゼ-ハイドロホービン共高発現株を取得するために、麹菌用ハイドロホービン高発現プラスミドを構築した。麹菌発現用ベクターである pPTR 1 ベクターを用いた。また、ハイドロホービンの高発現にはマルトースで強力に誘導がかかる glaA 142 promoter を目的遺伝子上流に融合した pPTR-gla-hyp を作製した。(図 10)



## (7-1) pPTR-gla-hyp の構築

## [材料]

pPTR-gla-hyp の構築にあたり 2 種類のベクター(pNGA 142 , pPTR 1')  
を使用し インサートの調製には実施例 2 で作成した pNG-enoP-hyp を使用  
5 した。

## [方法]

## ① 制限酵素によるDNAの切断

pNGA 142 と pNG-enoP-hyp各々を *Xba* I と *Sa* I により切断した。

## ② ベクターDNA、インサートDNAの調製

## 10 ③ ライゲーション

## ④ 大腸菌の形質転換

## ⑤ プラスミドDNAの調製

上記方法②から⑤については、実施例 2 と同様に行った。得られたプラスミ  
ドを *Xba* I と *Sa* I で切断後、アガロース電気泳動により挿入断片の存在を  
15 認め、pNG-gla-hypの完成を確認した。

## ⑥ 制限酵素によるDNAの切断

pPTR 1と pNG-gla-hyp 各々を *Pst* I , *Sma* I で切断した

## ⑦ ベクターDNA、インサートDNAの調製

## ⑧ ライゲーション

## 20 ⑨ 大腸菌の形質転換

## ⑩ プラスミドDNAの調製

上記方法⑦から⑩については、実施例 2 と同様に行った。得られたプラスミ  
ドを *Pst* I と *Sma* I で切断後、アガロース電気泳動により挿入断片の存在を  
25 認め、pPTR-gla-hypの完成を確認した。

## (7-2)クチナーゼ-ハイドロホービン共高発現麹菌の育種

アスペルギルス・オリゼ(実施例3-4 で得られたクチナーゼ高発現株)の形  
質転換はプロトプラスト-PEG法を改良した方法を用い、形質転換するプラスミ

ドDNAは上記で作製したpPTR-gla-hypを用いた。これらのプラスミドDNA 10  $\mu$ gをSac IIで完全消化し、定法によりフェノール抽出、エタノール沈澱処理を行った後 10  $\mu$ lのTEに溶解し形質転換用DNA溶液とした。以降のアスペルギルス・オリゼの形質転換については実施例 2 (2-2) に記した方法に従った。

5

但しプロトプラスト再生培地である Czapek-Dox 軟寒天培地には 100  $\mu$ g/ml となるようにピリチアミン (TaKaRa) を添加したものをを用いた。さらに培地上で形成した胞子をピリチアミンを含む Czapek-Dox 寒天培地に植え継ぐことで単胞子分離を行った。pPTR-gla-hypの胞子PCR用のプライマーとして

10 5'-ATTCGCGAAAATGGTAGCTCGAGGA-3' と

5'-CTGTGTCCCGTATGTAACGGTG -3' の 2種のオリゴヌクレオチドを合成した。PCR 用装置は PCR Thermal Cycler PERSONAL (宝酒造) を用いた。

ポジティブコントロールとして形質転換に使用にしたプラスミド DNA を鋳型とした。

15 1 分間 , 55.5°C , 1 分間 , 72°C , 90 秒間保持するサイクルを 30 サイクルおこなった後、72°C , 95 秒間で完全伸長させ4°C で保持した。得られた

PCR 増幅断片をアガロース電気泳動に供したところ、ポジティブコントロールと同じ位置に PCR 断片の増幅が確認され、その結果より、麹菌の染色体 DNA 上にglaA142 promoter—配列下流にハイドロホービン遺伝子の挿入された配

20 列の存在が確認された。

形質転換された クチナーゼ - ハイドロホービン共高発現株を 200ml の YPM 培地 [実施例 2 (2-2)] に $1 \times 10^6$ 胞子/ml濃度で植菌し、30°C , 24 時間振盪培養しガラスフィルターで菌体を濾過し、培養上清を得た。培養上清 200  $\mu$ l に対して 100  $\mu$ l の 100 (w/v%) 冷トリクロロ酢酸を加え、よく混合した後、氷中に 12-16 時間放置した。サンプルを  $15,000 \times g$  , 4°C , 20 分間遠心分離し上清を完全に除いた後、沈澱を 15  $\mu$ l のSDS化溶液 [実施例 2 (2-2)]に溶解させたあと、沸騰湯浴中に5分間放置し SDS化をおこない、これをサンプ

25

ルとした。以後の SDS-PAGEの方法は実施例 2 (2-2) に記した通りとした。  
SDS-PAGE に供した後、CBB 染色により14 kDa にクチナーゼ高発現株には  
確認されない バンドが確認されたことから、クチナーゼ- ハイドロホービン共高  
発現株が取得された(図11)。

5

## 実施例 8

(8) 麹菌アスペルギルス・オリゼ クチナーゼ高発現株、ハイドロホービン高発  
現株、クチナーゼ・ハイドロホービン共高発現株によるプラスチック分解試験 (

10 液体培養)

実施例2で作製したハイドロホービン高発現麹菌、実施例3で作製したクチナ  
ーゼ高発現麹菌、実施例7で作製したクチナーゼ・ハイドロホービン共高発現麹  
菌、及びコントロールとして pNGA142 株の胞子をYPM培地 (1(w/v%)酵母  
15 エキス, 2(w/v%) ペプトン, 4(w/v%) マルトース) に PBS 乳化液0.1 % を  
加えた培地に $1 \times 10^6$ 個/ml になるように植菌する。30 °C, 24 時間培養し培  
養液を MILACLOTH にて分離し培養ろ液の濁度を 630nm の波長で吸光度  
を測定しPBS 分解率を算出した。

その結果、クチナーゼ・ハイドロホービン共高発現株>クチナーゼ高発現株  
20 >ハイドロホービン高発現株>コントロール (pNGA142 株) の順序で濁度の低  
下が大きかった。(表6)

[表6]

使用菌株	濁度(OD <sub>630</sub> )	分解率
Blank	1.103	
25 pNGA142	1.023	7.25 %
ハイドロホービン 高発現株	0.831	24.66%
クチナーゼ高発現株	0.436	60.47%
クチナーゼ- ハイドロホービン共高発現株	0.383	65.28%

## 実施例 9

## (9) クチナーゼ-ハイドロホービン-アミラーゼ三重共高発現株の育種

- (9-1) 実施例 3-4 で得られたクチナーゼ高発現株を用いてクチナーゼ-ハイドロホービン-アミラーゼ三重高発現株を取得するために、ハイドロホービン高発現用プラスミド pPTR-eno-hyp を作製(図 12)した。また、麹菌  $\alpha$ アミラーゼ高発現用プラスミド pNG-amy(図 13)は東北大学大学院農学研究科応用生命科学生命工学研究室より分譲を受けた。また、ハイドロホービンの高発現には構成的に誘導がかかる eno A promoter を目的遺伝子の上流に融合させた pPTR-eno-hyp を作成した。 $\alpha$ -アミラーゼの高発現には、マルトースで強力に誘導がかかる glaA 142 promoter を目的遺伝子の上流に融合させた pNG-amy も分譲を受けた。

## [材料]

- 15 pPTR-enoP-hyp の構築にあたりベクターに pPTR 1 を使用し インサートは実施例 2 で作成した pNG-enoP-hyp を使用した。

## [方法]

## ① 制限酵素による DNA の切断

pPTR 1 と pNG-enoP-hyp 各々を *Pst* I と *Sma* I により切断した。

- 20 ② ベクター DNA、インサート DNA の調製

## ③ ライゲーション

## ④ 大腸菌の形質転換

## ⑤ プラスミド DNA の調製

- 上記方法②から⑤については、実施例 2 と同様に行った。得られたプラスミドを *Pst* I と *Sma* I で切断後、アガロース電気泳動により挿入断片の存在を認め、pPTR-enoP-hyp の完成を確認した。

## (9-2) クチナーゼ-ハイドロホービン-アミラーゼ三重共高発現麹菌の育種

- アスペルギルス・オリゼの形質転換はプロトプラスト-PEG法を改良した方法を用い、形質転換するプラスミドDNAは上記で作製したpPTR-enoP-hypとpNG-amyを用いた。pPTR-enoP-hyp プラスミド DNA 10  $\mu$ g を *Sac* II で完全消化し、定法によりフェノール抽出、エタノール沈澱処理を行った後 10  $\mu$ l の TE
- 5 に溶解し形質転換用DNA溶液とした。さらに pNG-amy プラスミド DNA については 10  $\mu$ g を制限酵素処理をせずに 10  $\mu$ l の TE に溶解し形質転換用DNA溶液とした。以降のアスペルギルス・オリゼの形質転換については実施例 7 (7-1-2) に記した方法を踏襲した。pPTR-enoP-hypの胞子PCR用のプライマーとして5'-ATTCGCGAAAATGGTAGCTCGAGGA-3' と
- 10 5'-CTGTGTCCCGTATGTAACGGTG -3' の 2種のオリゴヌクレオチドを合成した。pNG-amy の胞子PCR 用のプライマーとして5'-GGTTCGCTTCGTAAGTCTTCCTT-3' と5'-GTAGAATCACGAATGAGACCTTTGACGACC-3' のオリゴヌクレオチドを合成した。PCR 用装置は PCR Thermal Cycler PERSONAL (宝酒造) を用いた。ポジティブコントロールとして形質転換に使用にしたプラスミド DNA を鋳型
- 15 とした。pPTR-gla-hypの増幅反応は 95°C , 3 分間鋳型 DNA を変性し、94°C , 1 分間 , 55.5°C , 1 分間 , 72°C , 90 秒間保持するサイクルを 30 サイクルおこなった後、72°C , 95 秒間で完全伸長させ4°C で保持した。得られたPCR 増幅断片をアガロース電気泳動に供したところ、ポジティブコントロールと
- 20 同じ位置に PCR 断片の増幅が確認され、その結果より、麹菌の染色体 DNA 上にenoA promoter配列下流にハイドロホービン遺伝子の挿入された配列とglaA 142 promoter 配列下流に $\alpha$ アミラーゼ遺伝子の挿入された配列の存在が確認された。
- 25 形質転換された クチナーゼ - ハイドロホービン共高発現株を 200ml の YPM 培地 [実施例 2 (2-2)] に $1 \times 10^8$ 胞子/ml濃度で植菌し、30°C , 24 時間振盪培養しガラスフィルターで菌体を濾過し、培養上清を得た。培養上清 200  $\mu$ l に対して 100  $\mu$ l の 100 (w/v%) 冷トリクロロ酢酸を加え、よく混合した後

、氷中に 12-16 時間放置した。サンプルを  $15,000 \times g$  ,  $4^{\circ}\text{C}$  , 20 分間遠心分離し上清を完全に除いた後、沈澱を  $15 \mu\text{l}$  の SDS 化溶液 [実施例 2 (2-2)] に溶解させたあと、沸騰湯浴中に 5 分間放置し SDS 化をおこない、これをサンプルとした。以後の SDS-PAGE の方法は実施例 2 (2-2) に記した通りとした。

- 5 SDS-PAGE に供した後、CBB 染色により  $14 \text{ kDa}$  にクチナーゼ高発現株には確認されないバンドが確認されたことから、クチナーゼ-ハイドロホービン- $\alpha$  アミラーゼ三重共高発現株 (*A. oryzae* pN-cha 株) がハイドロホービンを高発現することが確認された。(図 14)。

#### 10 (9-3) $\alpha$ アミラーゼ発現の確認

- 次いで生分解性プラスチック PBS の分解に共役した、物質生産の例として工業用酵素  $\alpha$ -アミラーゼの生産を行った。表 5 同様の培地を用いて、実施例 7 で作製したクチナーゼ-ハイドロホービン共高発現株、及び本実施例で作製したクチナーゼ-ハイドロホービン-アミラーゼ三重共高発現株 (*A. oryzae* pN-cha 株) の培養を行った。コントロールとして pNGA142 のインサートを持たないベクターのみを有する pNGA142 株を用いた。培地に  $1 \times 10^6$  個の胞子を接種し、 $30^{\circ}\text{C}$  で 24 時間培養した。培養液を MIRACLOTH でろ過して菌体を除き、培養ろ液を得、 $15,000 \times g$  ,  $4^{\circ}\text{C}$  , 10 分間遠心分離し残存する PBS を完全に除き培養上清を得た。 $\alpha$ -アミラーゼ活性の測定は、培養上清を水にて 100 倍に希釈したものを
- 15
- 20
- を用い実施例 6 の方法と同様のヨウ素呈色法にて測定した。

- 即ち、測定用試薬溶液として、A 液;  $50 \text{ mM}$  トリス緩衝液 ( $\text{pH } 6.8$ ) 中に可溶性澱粉を  $0.2 \%$  となるように溶かしたもの、B 液;  $1 \text{ N}$  塩酸中にヨウ素を  $2 \times 10^{-4} \%$ 、ヨウ化カリウムを  $2 \times 10^{-3} \%$  になるように溶かしたものを調製した。A 液  $400 \mu\text{l}$  に  $50 \mu\text{l}$  の希釈した培養上清を加え  $37^{\circ}\text{C}$  で 10 分間反応させた。そこに B 液を  $50 \mu\text{l}$  加え、よく混合し、直ちに  $620 \text{ nm}$  の吸光度を測定し、Blank (未接種) の値に比した吸光度の減少量を  $\alpha$ -アミラーゼの相対活性量として表 7 に示した。 $\alpha$  アミラーゼ活性測定結果からアミラーゼ遺伝子を挿
- 25

入した三重高発現株がもっとも高い $\alpha$ アミラーゼ活性を示したことから、三重共高発現株の取得を確認した。

[表7]

5

strain	$\alpha$ -amylase 相対活性 ( $\Delta OD_{620}$ )
Blank	0
Control(pNGA142)	0.078
gla-cut-eno-hyp	0.1
gla-cut-eno-hyp-amylase	0.185

10

## 実施例10

### (10) ハイドロホービンホモログ

#### 15 (10-1) *Aspergillus oryzae* EST データベースを用いたハイドロホービンホモログの探索

現在までに報告されている糸状菌、担糸菌のハイドロホービンの塩基配列、アミノ酸配列 から *A. oryzae* EST データベースに対して BLAST ネットワークサービスを用い、相同性の高いクローン情報を探索した。

20

探索結果として *Aspergillus oryzae* ハイドロホービン hyp B (*Aspergillus oryzae* EST データベースのマッチング結果: 塩基配列のe値: 0.0、アミノ酸配列のe値:  $6e-36$ ) (配列表2)、*Pholiota nameko* ハイドロホービンと相同性 (*Aspergillus oryzae* EST データベースのマッチング結果: 塩基配列のe値: 0.029、アミノ酸配列のe値:  $1e-19$ ) を示すクローン hydrophobin-315 (配列表3) の情報が得られ、ハイドロホービンに保持されている8つのシステイン残基を含んでいた。このことより、このクローンは *A. oryzae* のハイドロホービンであることが明らかになった。

25

(10-2) 麹菌 *A. oryzae* ハイドロホービン遺伝子ホモログのクローニングと高発現株の育種

(10-2-1) *hypB* のクローニング

- 5 BLAST ネットワークサービスの情報から *hypB* の ORF(オープンリーディングフレーム)を予想し、PCR にて増幅される断片に ORF が含まれるように 2種類のオリゴヌクレオチド 5'-CAACCCAACCGTCGACATGAAGTTCT-3' と 5'-GCCAAATGGCGTCTAGATTACAGACC-3' を合成しクローニング用の primer とした。鋳型 DNA として実施例3-3 で調整した *A. oryzae* RIB 40 染色体
- 10 DNA を使用した。PCR 用装置は PCR Thermal Cycler PERSONAL(宝酒造)を用いた。増幅反応は 95 °C , 3分間鋳型 DNA を変性し、95 °C , 1分間 , 57.2 °C , 30 秒間 , 72 °C , 90秒間保持するサイクルを30 サイクル行った後、72 °C , 90秒間で完全伸長させ 4 °Cで保持した。実際に PCR によって
- 15 PCR で目的遺伝子に変異が入っているかを確認するため、塩基配列のシーケンスを行った。PCR 増幅断片をアガロース電気泳動に供し長波長 (363nm) UV 下で DNA フラグメントを切り出し prep A gene (BIO-Rad-Laboratories) にて DNA を回収した。PGEM-T Easy Vector Systems(Promega) を使用し回収したPCR 断片をPGEM-T Easy Vector Systems に添付のプロトコルに沿ってTA クローニングを行った。このプラスミド DNA (TA-*hypB*)中の挿入 DNA 断片の塩基配列を ABI PRISM™ 377 DNA sequencer Long Read (PE
- 20 Biosystem) のプロトコルに従い、ABI PRISM™ 377 DNA sequencing system (PE Biosystem) にて解析した。解析結果から PCR 反応によって得られた増幅断片中の塩基配列の変異は確認されなかった。

25

(10-2-2) *hyp B* 高発現プラスミドの構築

*hyp B* 高発現麹菌を育種するために、麹菌用 *hyp B* 高発現プラスミドを構築した。麹菌発現用ベクターである pNGA142 系ベクターを用いた。また *hyp B*



高発現にはマルトースで強力に誘導がかかる *glaA* 142 promoter を目的遺伝子の上流に融合させた pNG-*gla*-hyp B を作製した。(図15)

#### [材料]

- 5 pNG-*gla*-hypB の構築にあたりベクターをpNGA142をインサートはTA-hyp Bを使用した。

#### [方法]

##### ① 制限酵素によるDNAの切断

pNGA 142 と TA-hypB 各々を *Xba* I と *Sa* I により切断した。

- 10 ② ベクターDNA、インサートDNAの調製

##### ③ ライゲーション

##### ④ 大腸菌の形質転換

##### ⑤ プラスミドDNAの調製

- 15 上記方法②から⑤については、実施例 2 と同様に行った。得られたプラスミドを *Xba* I と *Sa* I で切断後、アガロース電気泳動により挿入断片の存在を認め、pNG-*gla*-hypBの完成を確認した。

#### (10-2-3) *hyp B* 高発現株の育種

- 20 アスペルギルス・オリゼの形質転換はプロトプラスト-PEG法を改良した方法を用い、形質転換するプラスミドDNAは上記で作製したpNG-*gla*-hyp Bを用いた。これらのプラスミドDNA10  $\mu$ gを *Mun* I で完全消化し、定法によりフェノール抽出、エタノール沈澱処理を行った後 10  $\mu$ lのTEに溶解し形質転換用DNA溶液とした。以降のアスペルギルス・オリゼの形質転換についてはは実施例 2 (2-2) に記した方法を踏襲した。集菌した菌体を実施例2と同様にpNG-*gla*-hypBを用い
- 25 て形質転換し、PNG-*gla*-hyp Bの胞子PCR用のプライマーとして
- 5'-CAACCCAACCGTCGACATGAAGTTCT-3' と
- 5'-GTAGAATCACGAATGAGACCTTTGACGACC-3' の 2種のオリゴヌクレオチドを合成した。PCR 用装置は PCR Thermal Cycler PERSONAL (宝酒造)

を用いた。ポジティブコントロールとして形質転換に使用にしたプラスミド DNA を鋳型とした。pNG-gla-hyp Bの増幅反応は 95℃, 3 分間鋳型 DNA を変性し、94℃, 1 分間, 57.0℃, 1 分間, 72℃, 90 秒間保持するサイクルを 30 サイクルおこなった後、72℃, 95 秒間で完全伸長させ4℃ で保持した。

- 5 得られた PCR 増幅断片をアガロース電気泳動に供したところ、ポジティブコントロールと同じ位置に PCR 断片の増幅が確認され、その結果より、麴菌の染色体 DNA 上にglaA142 promoter—配列下流にhyp B遺伝子の挿入された配列の存在が確認された。

#### 10 (10-2-4) hydrophobin-315 のクローニング

- A.oryzae* EST データベースの情報から hydrophobin-315 の ORF(オープンリーディングフレーム)を予想し、PCR にて増幅される断片に ORF が含まれるように 2種類のオリゴヌクレオチド 5'-CTGCTTCCTTTGTCGACATGAAGGT-3' と 5'-TCAATGGTCTAGAAGCCCTTGGC-3' を合成しクローニング用の primer とした。鋳型 DNA として実施例3-3 で調整した *A.oryzae* RIB 40 染色体DNA を使用した。PCR 用装置は PCR Thermal Cycler PERSONAL(宝酒造)を用いた。増幅反応は 95℃, 3分間鋳型 DNA を変性し、95℃, 1分間, 55.4℃, 30 秒間, 72℃, 90秒間保持するサイクルを30 サイクル行った後、72℃, 90秒間で完全伸長させ 4℃で保持した。実際に PCR によって DNA 断片が増幅されているかをアガロース電気泳動により確認した。さらに PCR で目的遺伝子に変異が入っているかを確認するため、塩基配列のシーケンスを(8-2-2)の方法と同様に行った。解析結果から PCR 反応によって得られた増幅断片中の塩基配列の変異は確認されなかった。

#### 25 (10-2-5) hydrophobin-315 高発現プラスミドの構築

hydrophobin-315 高発現麴菌を育種するために、麴菌用 hydrophobin-315 高発現プラスミドを構築した。麴菌発現用ベクターである pNGA142 系ベクターを用いた。またhydrophobin-315 高発現にはマルトースで強力に誘導がかかる

glaA 142 promoter を目的遺伝子の上流に融合させた  
pNG-gla-hydrophobin-315 を作製した。(図16)

[材料]

- 5        pNG-gla-hydrophobin-315 の構築にあたりベクターはpNGA142をインサートはTA-hydrophobin-315を使用した。

[方法]

① 制限酵素によるDNAの切断

- 10        pNGA 142 と TA-hydrophobin-315 各々を *Xba* I と *Sa* I により切断した。

② ベクターDNA、インサートDNAの調製

③ ライゲーション

④ 大腸菌の形質転換

⑤ プラスミドDNAの調製

- 15        上記方法②から⑤については、実施例 2 と同様に行った。得られたプラスミドを *Xba* I と *Sa* I で切断後、アガロース電気泳動により挿入断片の存在を認め、pNG-gla-hydrophobin-315の完成を確認した。

(10-2-6)hydrophobin-315 高発現株の育種

- 20        アスペルギルス・オリゼの形質転換はプロトプラスト-PEG法を改良した方法を用い、形質転換するプラスミドDNAは上記で作製した

pNG-gla-hydrophobin-315を用いた。これらのプラスミドDNA10  $\mu$  gを *Mun* Iで完全消化し、定法によりフェノール抽出、エタノール沈澱処理を行った後 10  $\mu$  lのTEに溶解し形質転換用DNA溶液とした。以降のアスペルギルス・オリゼ

- 25        の形質転換についてはは実施例 2 (2-2) に記した方法を踏襲した。

pNG-gla-hydrophobun-315の形質転換は、実施例2の形質転換と同様に行って、形質転換体をpNG-gla-hydrophobin-315の胞子PCR用のプライマーとして 5' - CTGCTTCCTTTGTGCGACATGAAGGT-3' と

5' -GTAGAATCACGAATGAGACCTTTGACGACC -3' の 2 種のオリゴヌクレオチドを合成した。PCR 用装置は PCR Thermal Cycler PERSONAL (宝酒造) を用いた。ポジティブコントロールとして形質転換に使用にしたプラスミド DNA を鋳型とした。pNG-gla-hydrophobin-315 の増幅反応は 95°C , 3 分間鋳型 DNA を変性し、94°C , 1 分間 , 57.0°C , 1 分間 , 72°C , 90 秒間保持するサイクルを 30 サイクルおこなった後、72°C , 95 秒間で完全伸長させ 4°C で保持した。得られた PCR 増幅断片をアガロース電気泳動に供したところ、ポジティブコントロールと同じ位置に PCR 断片の増幅が確認され、その結果より、麴菌の染色体 DNA 上に glaA142 promoter 配列下流に hydrophobin-315 遺伝子の挿入された配列の存在が確認された。

#### (10-2-7)カビのハイドロホービン相同遺伝子

以上、プラスチックに吸着性の麴菌のハイドロホービン遺伝子群の単離を述べたが、それら DNA 及びアミノ酸配列を既知の DNA 及びタンパク質データベースに対して検索を行った。その結果を、遺伝的系統樹として図 17 に示した。その結果、イモチ菌 *Magnaporthe grisea*、*Aspergillus fumigatus*、*Aspergillus nidulans* に相同遺伝子が存在することが明らかとなった。これらはいずれもハイドロホービン特有のシステイン残基を有していたことから、ハイドロホービンであることが確認される。これら遺伝子産物も、プラスチックの疎水表面に吸着し、生分解性プラスチック分解酵素と共同して、プラスチック分解を促進する因子として働くと予想される。

尚、図 17 に示された各ハイドロホービン遺伝子のアノテーションに関する現時点での情報は以下の通りである。

#### 25 *Magnaporthe grisea* MPG1

→植物感染に重要な接着因子。クローニング済

ACCESSION NO. L20685(Nucleotide) , AAA20128(Protein)

*Aspergillus fumigatus* Rod A

→アスペルギル症感染に重要な因子。クローニング済

ACCESSION NO . AF057335(Nucleotide) , AAB60712(Protein)

5 *Aspergillus fumigatus* Rod B

→ウイルスの孢子への感染を防ぐ。クローニング済

AEM .Mar . 2003 . p1581-1588

*Aspergillus nidulans* Rod A

10 →孢子形成時に発現し菌体表面を疎水性にする。クローニング済

ACCESSION NO . M61113(Nucleotide) , AAA33321(Protein)

*Aspergillus nidulans* DewA

→孢子形成時に発現し菌体表面を疎水性にする。クローニング済

15 ACCESSION NO . U07935 (Nucleotide) , S67924(Protein)

*Aspergillus oryzae* DewA

→*A.nidulans* の hydrophobin (*Aspergillus nidulans* Dew A) と相同性をもつ  
ものとして見出された。

20

*Aspergillus oryzae* RolA

LOCUS AB094496 861 bp DNA linear PLN 07-MAR-2003

DEFINITION *Aspergillus oryzae* rolA gene for hydrophobin putative,  
complete cds.

25 ACCESSION AB094496

VERSION AB094496.1 GI:28875528

SOURCE *Aspergillus oryzae*

ORGANISM *Aspergillus oryzae*

Eukaryota; Fungi; Ascomycota; Pezizomycotina;

Eurotiomycetes;

Eurotiales; Trichocomaceae; mitosporic Trichocomaceae;

*Aspergillus*.

5 REFERENCE 1

AUTHORS Takahashi,T., Yoneda,S., Maeda,H., Yamagata,Y., Abe,K.,  
Machida,M., Gomi,K. and Nakajima,T.

TITLE Hyper induction of a Hydrophobin-like protein, RolA, of  
*Aspergillus oryzae* by polybutylenesuccinate in liquid culture

10 JOURNAL Unpublished

*Aspergillus oryzae* nameko(hydrophobin-315)

新規遺伝子(実施例10参照)

15 *Aspergillus oryzae* HypB

→本遺伝子及びその発現産物であるタンパク質は既知であり、以下のアクセ  
ッション番号にて登録されている。クローニングは既報の情報を基に行い、*A.*  
*oryzae* 染色体 DNA より単離した(実施例 10)。また本遺伝子はPBS 存在  
時に特異的に発現することを確認している。

20 ACCESSION NO . AB097448(Nucleotide) , BAC77248(Protein)

実施例11

(11) Rol A の生分解性プラスチックへの吸着

25 ハイドロホービン(Rol A )が存在する系での生分解性プラスチックの分解にお  
いて、Rol A は両親媒性という物理学的特性から、生分解性プラスチックの表  
面に吸着することが考えられた。生分解性プラスチックとしてフィルム状(1mm)の  
PBS , PBSA , PLA を用い Rol Aがこれらの生分解性プラスチックに吸着する

か否かを確認した。

#### (11-1) Hydrophobin (Rol A) 高発現麹菌からの Rol A の精製

実施例2 で得られた hydrophobin 高発現麹菌の胞子を  $1 \times 10^6$  個胞子/ml  
5 になるように、1%マルトースを含む1L の最少培地を入れた3L 容坂口フラスコ  
に接種し 30°Cで48時間培養した。培養液を MIRACLOTH (CALBIOCHEM) に  
て濾過し、培養上清を得た。培養上清に40% 飽和となるように硫酸アンモニウ  
ムを加えた後、 $8,000 \times g$ , 4°C, 20 分間遠心分離し得られた上清画分を得た。  
上清画分を 10 mM トリス-塩酸緩衝液, pH 8.0, 40 % 飽和硫酸アンモニウム  
10 にて平衡化した Octyl-Cellulofine (生化学工業)に供し、吸着画分を 40 - 0%  
飽和硫酸アンモニウムの直線濃度勾配による溶出させた。溶出させた全画分  
を SDS-page に供し、予想された大きさのところにバンドが確認された画分を  
回収した。回収した画分を 10mM クエン酸-NaOH 緩衝液 (pH.4.0) で透析し  
、同緩衝液で平衡化した S-Sepharose FF に供し吸着画分を NaCl, 0-0.5M  
15 の直線勾配で溶出させた。回収した全画分を SDS-PAGE に供し CBB 染色  
により 目的の大きさのバンドが均一であることが確認されたため、これを精製  
Rol Aとした。

#### (11-2) Rol A 抗体の作製

20 (11-1)で得た、RolA精製タンパク質を用いて、マウス抗RolA抗体を作製した(  
株式会社 ティーケークラフト)。

#### (11-3) イミューブロットティングによる生分解性プラスチックへの Rol Aの吸着の 確認

25 フィルム状のPBS, PBSA (昭和高分子) 及び PLA (三井化学)、コントロール  
としてスライドガラス に  $1\text{cm}^2$  に切り抜いたろ紙 (Whatman) に精製 Rol A 溶  
液 ( $2.5 \mu\text{g protein/ ml Tris-HCl buffer, pH 8.0}$ )を  $10 \mu\text{l}$ ろ紙にスポットし 30  
°C, 13時間, 湿度95% でインキュベートした。このフィルムを入れた容器に

11-2)で作製した一次抗体の1000 倍希釈液 (1% BSA , 0.05% Tween 20 , 10mM リン酸緩衝液 , pH7.2 , 0.9w/v NaCl) 10ml を加え1時間振盪し10mM リン酸緩衝液 pH7.2 で三回洗浄する。次に5000 倍した二次抗マウス抗体(生化学工業社製)希釈液 10ml を容器に入れ 30 分間軽く振盪し10mMリン酸  
5 緩衝液 pH7.2 で三回洗浄する。二次抗体にはアルカリフォスファターゼが固定化してあるため、基質として66  $\mu$ LのNBT(nitro blue tetrazdium 50mg/ml in 70 % dimethylformamide)を10mLのアルカリフォスファターゼ buffer (100mM Tris-HCl , PH 9.5) , 100mM NaCl , 5mM MgCl<sub>2</sub> と混合。その後、この溶液に 33  $\mu$ LのBIPC (50mg/mL in 70%dimethylformamide)を混合したものをを用いた。  
10 この基質溶液を フィルムの入っている容器に加え、生分解性プラスチックに吸着している RoI A を検出した。その結果、RoIAタンパク質は、ガラス表面には吸着せず、PBS, PBSA, PLAの全ての表面に吸着していることが検出された(図18)。

## 15 実施例 12

### (12)新規プラスチック分解酵素遺伝子の探索

#### (12-1) PBS分解酵素類似体遺伝子を含む染色体DNAのクローニング

PBS分解酵素類似体遺伝子を含む染色体DNAのクローニングを行なうにあたり、サザンハイブリダイゼーションに用いるプローブとなるPCR断片を以下の  
20 RT-PCR法により得た。

プローブ配列を取得するために、PBS存在下での培養時に発現している遺伝子群のライブラリーを取得した (以下cDNAライブラリーと省略)。0.5 x 10<sup>6</sup>個胞子/mlとなるようにアスペルギルス・オリゼRIB40胞子懸濁液を500 ml容三角フ  
25 ラスコ内の100 mlのCzapek-Dox培地 に添加した。添加後30℃, 24時間培養した。菌糸体をミラクロス (CALBIOCHEM) にて集菌し、滅菌水で洗浄後余分な水分を取り除いた。この回収した菌糸体を、PBSエマルジョンを唯一の炭素源とした最少培地へと移し、30℃, 3日間振盪培養を行った。培養終了後ミラクロ



スを用いて菌糸体を回収した。菌糸体から実施例1に従って、total RNA及び mRNAを取得した。次に、得られたmRNAを鋳型とした逆転写反応を行った。エッペンフチューブに、mRNA (92 ng/ $\mu$ l) 5  $\mu$ l、oligo (dT) primer (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l、2.5 mM dNTP MIX (2.5 mM each) 4  $\mu$ l、DEPC処理水 2  $\mu$ lを加え、

5 70°Cで10分間インキュベートした後氷上で1分間以上放置し、mRNAにoligo (dT) primerをアニーリングさせた。次に、この反応液に5×First Strand Buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3、375 mM KCl、15 mM MgCl<sub>2</sub>) 4  $\mu$ l、0.1 M DTT 2  $\mu$ lを加え、42°Cで5分間インキュベートした後、逆転写酵素 Super Script II RT (200 U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ lを加えピペッティングによる攪拌後42°Cで50分間インキュベ

10 ートし、さらにSuper Script II RT (200 U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ lを加えピペッティングによる攪拌後42°Cで50分間インキュベートし逆転写反応させた。この溶液を70°Cで15分間インキュベートすることで、逆転写酵素を失活させ、さらにRNaseH (10 U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ lを加え、37°Cで20分間インキュベートすることで、未反応mRNAを分解した。この逆転写反応で得られた溶液をcDNAライブラリー溶液とした。

15

次に実施例3にて同定したPBS分解酵素タンパク質(クチナーゼ)と、アスペルギルス・フミガタス由来の既知の類似酵素タンパク質の相同性の比較から、18塩基からなるミックスオリゴヌクレオチド

[5'-GT(T/C/A/G)GC(T/C/A/G)TG(T/C)CA(A/G)GG(T/C/A/G)GT(T/C/A/G)-3'] と15塩基からなるミックスオリゴヌクレオチド

20

[5'-(G/A)TA(C/T/G/A)CC(C/T/G/A)CC(C/T/G/A)GC(C/T/G/A)AC(T/G/A)AT-3'] を合成した。この1組のプライマーセットを用い、cDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行い、サザンハイブリダイゼーションのプローブを増幅した。

PCR用装置はPCR Thermal Cycler PERSONAL(宝酒造)を用いた。cDNAライ

25 ブラリーは上記のcDNAライブラリー溶液を1  $\mu$ l用い、ポリメラーゼはEx taq polymerase(宝酒造)を用いた。増幅反応は、95°C、3分間鋳型DNAを変性し、95°C、1分間、53°C、1分間、72°C、30秒間保持するサイクルを30サイクルおこなった後、72°C、1分間で完全伸長させ、4°Cで保持した。得られたPCR増幅断片

をアガロースゲル電気泳動に供したところ、およそ160塩基対からなる断片の増幅が確認された。

次に、NEN RandomPrimer Fluorescein Labeling Kit with

- 5 Antifluorescein-AP (Eizo Diagnostics, Inc.) を用いて実施例 3 (3-3) と同様にサザンハイブリダイゼーションをおこなった。ターゲットとして染色体DNA 10  $\mu$ gを50ユニットの *Hinc* II (宝酒造)または *Sac* I (宝酒造) と *Hind* III (宝酒造) で完全消化したものをを用いた。その結果 *Hinc* II にて完全消化した場合約 2700 塩基対からなり、*Sac* I と *Hind* III にて完全消化した場合約 1800 塩基
- 10 からなる強くハイブリダイズするバンドが検出された。

- 次に、実施例 3 (3-3) に従ってコロニーハイブリダイゼーションを行った。染色体DNA 10  $\mu$ gを50ユニットの *Hinc* II (宝酒造)または *Sac* I (宝酒造) と *Hind* III (宝酒造)で完全消化しアガロースゲル電気泳動に供しエチジウムブロ
- 15 マイドで染色後、各々、2700 塩基対、1800 塩基対付近のゲルをUV照射下で切り出した。ゲル中よりprep A gene (BioRad) を用いてDNAを抽出し、これを挿入DNA断片とした。

- 次にプラスミドpBluescript II KS+ DNA (Stratagene) 2.5  $\mu$ gを *Hinc*II (宝酒
- 20 造)または *Sac* I (宝酒造) と *Hind* III (宝酒造)にて消化し、定法によりフェノール抽出、エタノール沈殿処理をおこなった後、アルカリフォスファターゼ(宝酒造)により5' 末端のリン酸を除去した。この反応液を定法によりフェノール抽出、エタノール沈殿処理をおこなった後TEに溶解したものをベクターDNA溶液とした。さらに、前述の挿入 DNA 断片と連結させることで、連結 DNA 溶液を得た。これ
- 25 ら連結 DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、コロニーハイブリダイゼーションに供した。その結果ポジティブシグナルを得た。

次に元の寒天培地上からポジティブシグナルとなるプラスミドDNAを有する大

腸菌から実施例 3 (3-3) に記した方法によりプラスミドDNA溶液を得た。このプラスミドDNA中の挿入DNA断片の塩基配列を解析した。その結果、プラスミドDNAに挿入された 2713 塩基対からなる染色体 DNA の *Hinc* II 消化断片には、プローブの塩基配列を含むオープンリーディングフレームが見出され(配  
5 列表4)、また 1801 塩基対からなる染色体 DNA の *Sac* I/*Hind* III 消化断片には、プローブの塩基配列を含むオープンリーディングフレームが見出された(配列表5)。この 2 種のオープンリーディングフレームは各々 2 または 3 箇所のイントロン塩基配列を含み、さらに開始メチオニンをコードする塩基配列 ATG とストップコドンを含み、すなわち PBS 分解酵素類似体遺伝子の全長を有して  
10 いた。

#### (12-2) PBS 分解酵素ならびに PBS 分解酵素類似体の大腸菌を宿主とした発現系の構築

実施例 3 に記した PBS 分解酵素遺伝子、ならびに前述の 2 種の PBS  
15 分解酵素類似体遺伝子を含む cDNA ライブラリーを鋳型として PCR を行い、大腸菌用発現プラスミド (pET-12b; Novagen) に挿入すべく PCR 断片を調製した。前述の PBS存在下での培養時に発現している遺伝子群を含む cDNA ライブラリーに対して、PBS 分解酵素遺伝子に対しては、  
5'-TGCAGTGGCGGATCCGGTGGAC-3' と  
20 5'-GACCGGATGGATCCCGAAAATTTATCC-3' のオリゴヌクレオチドプライマーセットを、麴菌ゲノム中にて 2713 塩基対のオープンリーディングフレームからなる PBS 分解酵素類似体遺伝子に対しては、5'  
-GGCAGCAGGGGATCCCATCGCTG-3' と 5'  
-CGTAGCCCACACTCGGATCCTAAGCTGAC-3' のオリゴヌクレオチドプライマー  
25 ーセットを、麴菌ゲノム中にて 1801 塩基対のオープンリーディングフレームからなる PBS 分解酵素類似体遺伝子に対しては、5'  
-GGCGGCTGCGGATCCAGTAGATATC-3' と 5'  
-CAGTTCAGGGGGATCCTATAGAGTCC-3' のオリゴヌクレオチドプライマーセ

ットを合成し、PCR に用いた。PCR用装置はPCR Thermal Cycler PERSONAL (宝酒造)を用いた。cDNAライブラリーは上記のcDNAライブラリー溶液を1  $\mu$ l 用い、ポリメラーゼはEx taq polymerase(宝酒造)を用いた。増幅反応は、95°C、3分間鑄型DNAを変性し、95°C、1分間、57°C、1 分間、72°C、1 分間保持する

5 サイクルを30サイクルおこなった後、72°C、1 分間で完全伸長させ、4°Cで保持した。得られたPCR増幅断片を *Bam*H I (宝酒造)で消化し、アガロースゲル電気泳動に供しエチジウムブロマイドで染色後 UV 照射下で各々、625 塩基対、650 塩基対、759 塩基対からなる断片を切り出した。ゲル中より prep A gene (BioRad) を用いて DNA を抽出し、これを挿入 DNA 断片とした。次に塩基配

10 列中に T7 プロモーター配列とシグナル配列 (OmpT-leader sequence) を有するプラスミド pET-12b (Novagen) DNA 5  $\mu$ g をシグナル配列の直後にある制限酵素 *Bam*H I 認識配列の位置で *Bam*H I (宝酒造)で消化し、定法によりフェノール抽出、エタノール沈殿処理をおこなった後、アルカリフォスファターゼ (宝酒造)により 5' 末端のリン酸を除去した。この反応液を定法によりフェノール

15 ル抽出、エタノール沈殿処理をおこなった後 TE に溶解したものをベクター DNA 溶液とした。次に、ベクター DNA 1  $\mu$ g と挿入 DNA 断片 1.5  $\mu$ g を T4 DNA ligase (宝酒造)により連結させ、連結 DNA 溶液を得た。この連結 DNA 溶液 を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  (宝酒造)を形質転換し、各々のプラスミド DNA を保持する形質転換大腸菌を得た。形質転換大腸菌の培養菌体中より

20 前述と同様にプラスミド DNA を抽出し、この大腸菌形質転換用プラスミド DNA を得た (pET-cut, pET-cuthom1, pET-cuthom2)。このプラスミド DNA 1  $\mu$ g を 用い前述と同様にして、大腸菌 BL21-SI (Invitrogen) を形質転換し、NaCl を含まない 50  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含む LB 寒天培地上にて各々の形質転換株を取得した。

25

次に PBS 分解酵素遺伝子が挿入されたプラスミド DNA を用いて形質転換された大腸菌形質転換株 (pET-cut) と、PBS 分解酵素類似体遺伝子が挿入されたプラスミド DNA を用いて形質転換された大腸菌形質転換株 2 種

(pET-cuthom1、pET-cuthom2)と、挿入されていない (pET-12b にて形質転換した) 大腸菌形質転換株のコロニーを白金針にて拾い、LB 液体培地 (50  $\mu$ g/ml アンピシリン、NaCl を含まない) にそれぞれ植菌した。植菌後 37°C、16 時間振盪培養することで前培養とした。各々の前培養溶液 500  $\mu$ l を 500 ml 容坂口フラスコ内の50 mlのLB 培地 (0.5 % NaCl を含む) に添加した。添加後 30°C にて 12 時間振盪培養することで、目的の酵素タンパク質を培養上清中に誘導・発現させた。培養液50 mlを50 ml容マイクロチューブに移し、8000 g、10分間遠心分離し培養上清を得た。得られた培養上清に対して0.1 (v/v %) となるように PBS 乳化液を添加し、37°C にて保温し、その濁度の低下 (PBS の分解)によって PBS 分解酵素の発現を確認したところ、PBS 分解酵素遺伝子および PBS 分解酵素類似体遺伝子が挿入されたプラスミド DNA により形質転換された大腸菌形質転換株の培養上清中にのみその活性の存在が認められた(表8)。

15 [表 8]

	Plasmid Name	pET-12b Blank	pET-cut Cut(L1)	pET-cuthom1 Homologue1	pET-cuthom2 Homologue2
20 Substrate	PBSA	ND	83	57	19
	PLA	ND	3	6	4

ND ; not detected

次に上記と同様の方法で得られた培養上清に対して 0.1 (w/v %) となるようにポリ乳酸 (PLA) 乳化液を添加し、37°C にて保温し、その濁度の低下 (PLA の分解)によって PLA 分解活性の有無を確認したところ、PBS 分解酵素遺伝子および PBS 分解酵素類似体遺伝子が挿入されたプラスミド DNA により形質転換された大腸菌形質転換株の培養上清中にのみその活性の存在が認め

られた(表8)。すなわち実施例 3 で得られた PBS 分解酵素および、2 種の PBS 分解酵素類似体にはポリブチレンサクシネート (PBS) 分解活性と併せてポリ乳酸 (PLA) 分解活性をも有することが分かった。

#### 5 (12-3)イモチ菌由来の生分解性プラスチック分解酵素遺伝子群

これまでに麹菌アスペルギルス・オリゼ由来のPBS分解酵素遺伝子及びそのタンパク質の存在を確認したが、そこで麹菌のPBS分解酵素相同遺伝子を既知のDNA及びプロテインデータベースに対して検索した後、図19の系統樹を作成した。相同遺伝子の多くが糸状菌(カビ)由来であり、特に*Magnaporthe grisea*には8種の相同遺伝子の存在が確認された。そこで、*Magnaporthe grisea* 70-15株を以下の条件にてPBS乳化液若しくはPLA乳化液中で培養し、その培養上清中のPLAおよびPBSの分解活性を測定した(表9)。

即ち、Vogel-N 培地 (2% Sucrose) にて24℃、4日間振盪培養した後、菌糸体を濾過により取得し、C源が各々PBSA又はPLA乳化液 (1 w/v %) に限定されたVogel-N 培地に移し、24℃、2日間振盪培養した。各々の培養上清を濾過及び遠心分離により取得し、各培養上清にPBSA乳化液又はPLA乳化液を0.1 (w/v %) となるように加え、37℃にて24時間インキュベートし、O. D. 630を測定し、分解率 (Degradation ratio) を算出した。その結果、*Magnaporthe grisea* 70-15 株はPLA及びPBS分解活性を有することが明らかとなった。

[表9]

Carbon source	Substrate	Degradation ratio (%)
PBSA	PBSA	ND
PLA	PBSA	12
PBSA	PLA	63
PLA	PLA	30

ND ; not detected

尚、図19に示された各生分解性プラスチック分解酵素遺伝子のアノテーションに関する現時点での情報は以下の通りである。

*Aspergillus oryzae*

- 5           Cut (L1)           BAA07428.1 (protein), GI (gene): 949813  
          Homologue 1, 2   遺伝子、タンパク質としては未登録

*Aspergillus fumigatus*

- ・*Aspergillus fumigatus* ゲノムデータベース中において、tblastn 検索の結果  
10 見出された homologue であり、annotated gene ではない。よって遺伝子、タン  
パク質としての登録は行われていない。

CutA contig 4882 中に見出された遺伝子発現産物

CutB contig 4865 中に見出された遺伝子発現産物

CutC contig 4812 中に見出された遺伝子発現産物

15

*Aspergillus nidulans*

- ・*Aspergillus nidulans* ゲノムデータベース中において、tblastn 検索の結果見  
出された homologue である。genomic DNA として各 contig 毎に登録され  
ているが、以下の 3 種については annotated gene 並びに cutinase としての  
20 登録もない。

CutA AACD01000122.1 (protein), GI (gene): 29570975

CutB AACD01000129.1 (protein), GI (gene): 29570982

CutC AACD01000093.1 (protein), GI (gene): 29570946

25 *Magnaporthe grisea*

- ・Cut1-8 についてはすべてゲノムデータベース中において、annotation 済み。
- ・Cut1 のみがタンパク質的に cutinase として確認されている。
- ・Cut2-8 についてはいずれもデータベース中において、hypothetical protein と

して扱われている。

Cut1 P29292 (protein), GI (gene): 1345869, Locus: MG 1943.3

Cut2 Locus: MG 02301.3

Cut3 Locus: MG 11108.3

5 Cut4 Locus: MG 03792.3

Cut5 Locus: MG 05798.3

Cut6 Locus: MG 02393.3

Cut7 Locus: MG 00734.3

Cut8 Locus: MG 09100.3

10

以下 4 種の cutinase は既知の遺伝子及びタンパク質で、その機能も確認されているものである。

*Monilinia fructicola* Cut1 Q8TGB8 (protein), GI (gene): 29839372

*Fusarium solani* Cut1 K02640.1 (protein), GI (gene): 168145

15 *Nectria ipomoeae* Cut1 Q99174 (protein), GI (gene): 2493916

*Nectria haematococca* Cutinase Q96UT0 (protein), GI (gene):

20137890

以下の既知の遺伝子及びタンパク質は、その機能は確認されていないものである。

20

*Pyrenopeziza brassicae* Cut1 Q9Y7G8 (protein), GI (gene): 29839423

*Botryotinia fuckeliana* Cut1 W00298 (protein), GI (gene): 2493915

*Blumeria graminis* Cut1 Q8X1P1 (protein), GI (gene): 29839380

*Colletorichum capsici* Cut1 P10951 (protein), GI (gene): 117650

25 *Glomerella cingulata* Cut1 P11373 (protein), GI (gene): 117651

*Alternaria brassicicola* Cut1 P41744 (protein), GI (gene): 1169141

*Ascochyta rabiei* Cut1 P29292 (protein), GI (gene): 117649

*Mycosphaerella rabiei* Cut1 P29292 (protein), GI (gene): 117649



## 実施例13

## (13) 麹菌アスペルギルス・オリゼからの生分解性プラスチック結合タンパク質と高発現株の育種

## 5 (13-1) 生分解性プラスチック結合タンパク質 (PbpA、PbpB) 遺伝子の取得

アスペルギルス・オリゼの染色体DNAより生分解性プラスチック結合タンパク質PbpA、PbpBのクローニングを行った。そしてアスペルギルス・オリゼのPbpA高発現株の育種を行ったのでその過程を以下に示す。

10

## [方法]

3 L容の三角フラスコに 1 (w/v %) となるように PBS 乳化液を含み、唯一の炭素源とした Czapek-Dox 培地を750 ml調製し、アスペルギルス・オリゼ RIB40 株の孢子懸濁液を終濃度  $1.0 \times 10^6$  となるように接種して5日間振盪培養した。その培養液をミラクロスで濾過し菌体を除いた。その濾液を20 % の硫酸アンモニウムで飽和させ1時間氷冷し、 $10,000 \times g$ 、 $4^\circ\text{C}$ にて30分間遠心分離による沈殿を除去した。その上清を10 mM Tris-HCl 緩衝液、pH 8.0、20 % 飽和硫酸アンモニウムで飽和させたオクチルセルロファイン カラム (生化学工業) に供し、硫酸アンモニウム濃度20-0 %の直線勾配で吸着タンパク質の溶出を行った。溶出フラクションに対してSDS-PAGEを行い溶出タンパク質の確認を行った。SDS-PAGE後のゲルはシルベストステイン、PAGE蛋白質用 (ナカライテクス) を用いて行い、方法は説明書に記載されている方法に基づいて行った。

15

20

硫酸アンモニウム0 % 飽和付近に分子量約14 kDaのタンパク質の存在を確認した (図20)。このタンパク質は疎水クロマトグラフィーの硫酸アンモニウム濃度0 % 飽和付近で溶出したことから、疎水性が高いタンパク質であることが考えられた。このタンパク質のN末端配列の解析を行ったところその配列は DASAVLADFNTLSTであった。

25

この配列を *Aspergillus oryzae* EST blast search

(<http://www.nrib.go.jp/ken/EST/db/blast.html>) にて相同性検索を行った結果、138残基のアミノ酸配列と相同性を示した。この138アミノ酸残基を日本

- 5 DNAデータバンク(<http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>)にて相同性検索を行った結果メタリジウム・アニソプリエの産生する4MeSタンパク質と相同性を示した。また、138アミノ酸残基をアスペルギルス・フミガタスのゲノムデータベース(<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/afu1/>)上で相同性を確認したところ、コン
- 10 ティグ4875内に含まれる配列と、コンティグ4820内に含まれる配列と相同性を示すことが明らかとなった。

尚、以上の相同性(パーセント)に関する具体的な値を表10に示した。

[表10]

	PbpA	4785	4MeS	4820	PbpB
PbpA	100	44.5	31.4	29.7	27.4
4785		100	32.7	25.0	29.4
4MeS			100	26.6	26.5
4820				100	60.2
PbpB					100

15

そこでこの両者の配列を基に、アスペルギルス・オリゼの染色体DNAからクローニングを試みることにした。

- アスペルギルス・フミガタスの相同配列とアスペルギルス・オリゼのコドン頻出
- 20 頻度(<http://www.kazusa.or.jp/codon/>)を参考にして二組のオリゴヌクレオチド(5'-ATGCTCGCCAAGCACGTC-3'、5'-GGCCTTCTTGTACTCGGC-3')、(5'-GACGCAATCTCCACCAC-3'、5'-TCAAACGCATCCGCAATCTG-3')を設計した。この2組のプライマーセットを用い、染色体DNAを鋳型としてPCRをおこないサザンハイブリダイゼーション用のプローブを増幅した。PCR用装置

は PCR Thermal Cycler PERSONAL(宝酒造)を用いた。染色体 DNA は 100 ng 用い、ポリメラーゼは Ex taq polymerase(宝酒造)を用いた。増幅反応は、95°C, 3分間 鑄型 DNA を変性し、95°C, 1分間、50°C, 1分間、72°C, 30 秒間保持するサイクルを 30 サイクルおこなった後、72°C, 1分間で完全伸長させ、4°Cで保持した。得られた PCR 増幅断片をアガロースゲル電気泳動に供したところ、約570塩基対と約300塩基対からなる断片の増幅が確認された。

次に、NEN RandomPrimer Fluorescein Labeling Kit with Antifluorescein-AP (Eizo Diagnostics, Inc.) を用いて実施例 3 (3-3) と同様 10 にサザンハイブリダイゼーションをおこなった。ターゲットとして染色体 DNA 10  $\mu$ g を 50 ユニットの *EcoRI*、*BamHI* (宝酒造)それぞれで完全消化したものを用いた。サザンハイブリダイゼーションの結果 *EcoRI* 消化断片に対して約570塩基対プローブを用いた時に約3000塩基対からなるバンドが検出され、*BamHI* 消化断片に対し300塩基対のプローブを用いた時に2000塩基対からなるバンド 15 が検出された。

次に、染色体 DNA 10  $\mu$ g を 50 ユニットの *EcoRI*、*BamHI* それぞれで完全消化しアガロースゲル電気泳動に供しエチジウムブロマイドで染色後3000塩基対および2000付近のゲルを UV 照射下で切り出した。ゲル中より prep A 20 gene (BioRad) を用いて DNA を抽出し、これを挿入 DNA 断片とした。

次にプラスミド pBluescript II KS+ DNA (Stratagene) 2.5  $\mu$ g を *EcoRI*、*BamHI* それぞれで(宝酒造)にて消化し、定法によりフェノール抽出、エタノール沈殿処理をおこなった後、アルカリフォスファターゼ(宝酒造)により 5' 末端 25 のリン酸を除去した。この反応液を定法によりフェノール抽出、エタノール沈殿処理をおこなった後 TE に溶解したものをベクター DNA 溶液とした。さらに、前述の挿入 DNA 断片と連結させることで、連結 DNA 溶液を得た。これら連結 DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、コロニーハイブリダイゼ

ーションに供した。その結果ポジティブシグナルを得た。

次に元の寒天培地上からポジティブシグナルとなるプラスミドDNAを有する大腸菌から実施例 3 (3-3) に記した方法によりプラスミドDNA溶液を得た。このプラスミドDNA中の挿入DNA断片の塩基配列を解析した。その結果、プラスミドDNAに挿入された 3008、及び2004塩基対からなる染色体 DNA の *EcoRI*、*BamHI* それぞれの消化断片には、約570、300塩基対それぞれのプローブの塩基配列を含むオープンリーディングフレームが見出された。前者のオープンリーディングフレームは584塩基対 (PbpA - 配列表6) で後者は561塩基対 (PbpB - 配列表7) であり、変換された推定アミノ酸配列はそれぞれ174残基及び186アミノ酸残基であった。また、前者オープンリーディングフレームは 1箇所

のイントロン塩基配列を含み、後者はイントロンを含んでいなかった。

両アミノ酸配列と麹菌ESTデータベースより得られた138アミノ酸を比較した結果、前者のものと100 %の相同性を示した。したがって前者の配列が目的のタンパク質であることが明らかになった。

#### (13-2) PBS結合タンパク質高発現麹菌の育種

#### 20 PBS結合タンパク質高発現系の構築 (図21)

クローニングされた目的遺伝子の周辺塩基配列を参考に一組のオリゴヌクレオチドを設計した(5'-CTTGCATTCAAGTCGACCTGAACAC-3'、5'-CTATTGAACTATGCTTCTAGAAGGCCTAATC-3')。アスペルギルス・オリゼRIB40株のゲノムDNAをテンプレートとしてPCR反応を行った。増幅反応は、

25 95°C, 3 分間 鋳型 DNA を変性し、95°C, 1 分間、60°C, 1 分間、72°C, 30 秒間保持するサイクルを 30 サイクルおこなった後、72°C, 1 分間で完全伸長させ、4°Cで保持した。そのPCRによる増幅断片をアガロース電気泳動にて確認を行ったところ約730塩基対の増幅が見られた。この増幅断片を *Sa/I* (宝酒造) 及び

*Xba* I (宝酒造) で消化し、その消化断片をアガロースゲル電気泳動に供したゲル中より prep A gene (BioRad) を用いて DNA を抽出し、これを挿入 DNA 断片とした。次に塩基配列中にグルコアミラーゼのプロモーター配列 (PglaA 142) を有するプラスミド pNGA142 DNA 5  $\mu$ g を *Sa* I 及び *Xba* I で消化し、定法

5 によりフェノール抽出、エタノール沈殿処理をおこなった後、アルカリフォスファターゼ (宝酒造) により 5' 末端のリン酸を除去した。この反応液を定法によりフェノール抽出、エタノール沈殿処理をおこなった後 TE に溶解したものをベクター DNA 溶液とした。次に、ベクター DNA 1  $\mu$ g と挿入 DNA 断片 1.5  $\mu$ g を T4 DNA ligase (宝酒造) により連結させ、連結 DNA 溶液を得た。この連結

10 DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  (宝酒造) を形質転換し、各々のプラスミド DNA を保持する形質転換大腸菌を得た。形質転換大腸菌の培養菌体中より前述と同様にプラスミド DNA を抽出し、この麹菌形質転換用プラスミド DNA を得た実施例 3 (3-3) に記した方法により培養菌体中よりプラスミド DNA を抽出し、麹菌形質転換用プラスミド DNA を得た。このプラスミド DNA 10  $\mu$ g

15 を *Bam* H I で消化し、定法によりフェノール抽出、エタノール沈殿処理をおこなった後 10  $\mu$ l の TE に溶解し形質転換用 DNA 溶液とした。以降のアスペルギルス・オリゼの形質転換については実施例 7 (7-1-2) に記した方法を踏襲して行い、形質転換体を得た。また孢子 PCR 用プライマーとして、2 種のオリゴヌクレオチド (5' - CTTGCATTCAAGTCGACCTGAACAC - 3',

20 5' -GTAGAATCACGAATGGAGCCTTTGACGACC-3') を合成した。PCR 用装置は PCR Thermal Cycler PERSONAL (宝酒造) を用いた。ポジティブコントロールとして麹菌形質転換用プラスミド DNA を鋳型とした。ポリメラーゼは Ex Taq polymerase (宝酒造) を用いた。増幅反応は、94°C, 3 分間鋳型 DNA を変性し、94°C, 1 分間、55.5°C, 1 分間、72°C, 90 秒間保持するサイクルを 30

25 サイクルおこなった後、72°C, 95 秒間で完全伸長させ、4°C で保持した。得られた PCR 増幅断片をアガロースゲル電気泳動に供したところ、ポジティブコントロールと同じ位置に PCR 断片の増幅が確認され、その結果より染色体 DNA 上にグルコアミラーゼ・プロモーター配列の下流に 目的遺伝子が連結した塩基配

列が挿入されたことと、それを有するアスペルギルス・オリゼ形質転換株が得られたことが確認された。この 目的遺伝子が染色体 DNA 中に挿入されたアスペルギルス・オリゼ形質転換株と、挿入されていない(pNGA142 にて形質転換した)アスペルギルス・オリゼ形質転換株の孢子懸濁液を  $0.5 \times 10^6$  個孢子  
5 /ml となるようにグルコアミラーゼ・プロモーターの誘導物質であるマルトースを含む 100 ml の YPM液体培地 [実施例 2 (2-2)] にそれぞれ添加した。添加後 30°C, 125 rpm, 16 時間培養し、培養上清をMIRACLOTH (GALBIOCHEM®) にて濾過することで得た。培養上清 100  $\mu$ l に 50  $\mu$ l の冷トリクロロ酢酸を加えよく混合した後、氷中で 20 分間放置し、15000 g, 4°C, 15  
10 分間遠心分離し上清を完全に除き、沈殿画分を得た。これに 15  $\mu$ l の SDS 化溶液 [実施例 2 (2-2)] に溶解させたあと、沸騰湯浴中に5分間放置し SDS 化をおこない、これをサンプルとした。以後の SDS-PAGEの方法は実施例 2 (2-2) に記した通りとした。SDS-PAGE に供した結果、目的遺伝子が染色体 DNA 中に挿入されたアスペルギルス・オリゼ形質転換株の培養上清中にのみ  
15 目的タンパク質の位置(約14 kDa)にバンドが観察された(図22)。その後、電気泳動したゲル中よりタンパク質を PVDF 膜に転写し、PVDF膜上より 約14 kDa のバンドを切り抜き、そのままアミノ末端アミノ酸配列の解析をおこなった。解析の結果アミノ末端からDASAV であったことから、この約14 kDaタンパク質が 目的タンパク質であることが確認された。

20

### (13-3) PbpA高発現株の疎水表面上での生育

φ90mmのプラスチックシャーレに20 gの粒状PBS(1 mm<sup>3</sup>)を入れ、15 mlの YPM液体培地を加えて、良くかき混ぜYPM培地を均一にした。その培地上に前述した高発現株、ハイドロホービン高発現株、そして野性株の孢子を10<sup>8</sup>個接種  
25 した後、良くかき混ぜ孢子を均一にした。またポリウレタン製の家庭用スポンジを縦、横6 cm、高さ1 cmに切り取り、十分にYPM液体培地をしみ込ませた。その中心部に約14 kDaタンパク質高発現株、ハイドロホービン高発現株、そして野性株の孢子を10<sup>8</sup>個接種した。この両培地を30°Cにて7日間培養を行ったとこ

ろ、疎水表面上での約14 kDaタンパク質及びハイドロホービン高発現株の生育は明らかに野性株のものを上回り旺盛な生育を示した(図23)。このことから今回高発現を行ったこのタンパク質は、実施例 1 に見出されたハイドロホービンと同様に、カビがPBSのような疎水表面上に展開するための補助因子であり、疎水表面への吸着を促すものと考えられた。そこで、このタンパク質をPBS binding protein とし、PbpAとした。そしてPbpAのクローニングの際に得られた相同配列をPbpBとした。

(13-4) *in vitro*でのPbpAのPBSへの吸着

10 PbpA高発現株の胞子を750 mlのYPM液体培地に $10^6$  (/ml)になるように接種して2日間培養を行った。その培養液をミラクロスにて濾過し、その濾液に60 %になるように硫酸アンモニウムを加え1時間氷冷した。 $10,000 \times g$ 、 $4^\circ\text{C}$ にてその濾液を遠心分離し沈殿物を除去した。その遠心上清をオクチルセルロファイ

15 ロースカラム FF(ファルマシア)に供しPbpAをSDS-PAGE的に単一バンドになるまで精製を行った。

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)バッファーに濃度が0、10、20、30、40、50、60、70、80、90 %になるように硫酸アンモニウムを加えた。それぞれ1 mlのバッファーに

20 対して0.2 gのPBS粉末( $1 \text{ mm}^3$ )を加えよく懸濁した。このPBS懸濁液に対してPbpA精製標品(0.1 mg/ml)を $100 \mu\text{l}$ 加えて $30^\circ\text{C}$ にて3時間振盪(125 rpm)し、吸着処理を行った。この混合液をフィルター(孔径 $0.2 \mu\text{m}$ ミリポア)に通して完全にPBSを除き、その濾過液をSDS-PAGEに供した(図24)。

25 その結果、硫酸アンモニウム濃度0、10、20 % 時の濾過液中にはPbpAの存在が確認されたが30 %以降は濾過液中にPbpAは見られなかった。この結果よりPbpAは硫酸アンモニウム30%存在下でPBSに吸着していることが示唆される。

## (13-5)PbpA相同遺伝子

以上、*Aspergillus oryzae*にはPBSなどの生分解性プラスチック表面への吸着因子PbpA及びPbpBが存在することを示したが、既存のDNAデータベース検索から、カビ アスペルギルス・フミガタスとメタリジウム・アニスプリエに相同遺伝子5 子が存在することが見出された(図25)。これら遺伝子産物の機能はこれまで全く推定されていなかったが、PbpAの結果から、同様にプラスチック吸着機能を有するタンパク質と考えられる。

尚、図25に示された各PbpA及びPbpB相同遺伝子のアノテーションに関する10 現時点での情報は以下の通りである。

*Aspergillus oryzae* PbpA

*Aspergillus oryzae* PbpB

本実施例に記載。

15

*Aspergillus fumigatus* contig 4875内の配列

PbpAと相同性を示す配列で塩基配列、アミノ酸配列共に*A. fumigatus* のゲノムデータベースより取得された。発現は確認されておらず、機能未知。

*Aspergillus fumigatus* contig 4820内の配列

20 PbpBと相同性を示す配列で塩基配列、アミノ酸配列共に*A. fumigatus* のゲノムデータベースより取得された。発現は確認されておらず、機能未知。

*Metarhizium anisopliae* 4MeS

ACCESSION No. AF012092 (Nucleotide), ACCESSION No. AAB69311 (Protein)

25

*M. anisopliae* を培養時のcDNAから得られた配列。培養条件は不明。機能も全く分かっていない。



#### (14) 生分解性プラスチックと他のマテリアルとの複合材料からの生分解性プラスチックの選択的分解

生分解性プラスチック複合材料から生分解性プラスチックを分解酵素により  
5 選択的に分解し、生分解性プラスチックはモノマー及びオリゴマーとして可溶性  
区分に回収し、もう一方の複合材料を回収する。

今回、複合材料の一方は白金線、生分解性プラスチックにはPBSを用いた。  
分解酵素には実施例3に記載したPBS分解酵素精製標品(クチナーゼ)を用い  
10 た。100ml容ビーカー内に20(w/v %)となるように20mlのクロロホルムに4 g PBS  
を溶解した。この溶液にひたしたφ0.5mm白金線を取り出した後、乾燥させ表面  
をPBSで被膜した金属(白金線)断片を得た。12mm×90mm試験管中にて蒸留  
水で洗浄した0.5mm×8mmのPBS被膜金属断片に対し、600 μl の120 μg/ml  
15 PBS分解酵素溶液(50mM トリス-塩酸緩衝液, pH9.0)を加え、37℃にて、1N  
NaOHにてpHを9.0に保持しながら7日間保温した(コントロールとして50mM トリ  
ス-塩酸緩衝液, pH9.0を用いた)。その結果、酵素添加区においてPBS被膜が  
選択的に分解され金属断片は固型物として回収された(図26)。この結果より、  
生分解性プラスチックと他の材料との複合材料より、生分解性プラスチックとも  
う一方の複合材料を分別して回収可能なことを示している。

20

#### 実施例15

(15-1)クチナーゼによるPBSフィルムの分解に対する Rol Aの 分解促進効果  
76×26mm のスライドガラス (MATSUNAMI)社製 に同じ大きさに切り出した  
25 PBS フィルムに 10mM Tris-HCl buffer pH8.0 に溶解した RolA (2.5 μg/ml)  
を 10 μlしみ込ませたろ紙(1cm<sup>2</sup>)(Whatman)を置き、12時間、30℃で反応させ  
た。コントロールには、Rol Aが溶解している bufferを10 μlしみ込ませたろ紙  
(1cm<sup>2</sup>)をPBS フィルム上に置いた。12 時間後 20 μg/ml 濃度のcutinase 10

5  $\mu$ lをろ紙に加え 6 時間 , 37°Cで分解反応を行った。分解反応後、ろ紙を置いていた所が白く濁っているのが観察された。濁度は RolA を前もって吸着させていたろ紙の方が高く、Rol Aを吸着させていなかった方の濁度は低かった。予備実験の結果より cutinase によるPBS フィルム分解では、PBS 分解率が高い程、cutinase 接触面が白濁することが、分かっている。これらの結果から、Rol Aによる cutinase のPBS 分解が促進されることが分かった(図27)。図27では白黒が反転して表示されており、黒い部分が分解を示している。

10 (15-2) クチナーゼによるPBS 乳化液の分解に対するRolAの 分解促進効果  
96穴マイクロタイタープレートに0.1w/v に調整した PBS 乳化液 89.5  $\mu$ lを入れ、そこに10mM Tris-HCl buffer pH8.0 に溶解した RolA ( 250ng/ml) を 10  $\mu$ l 加え 12時間 , 30°Cで Rol A の PBS への吸着反応を行った。コントロールとして Rol A の代わりに10mM Tris-HCl buffer pH8.0 を10  $\mu$ l PBS 乳化液に加えたものを用いた

15 吸着反応後、10mM Tris-HCl buffer pH8.0 に溶解した1mg/ml 濃度の cutinase を0.5  $\mu$ l加え 40°Cで分解反応を行い、30 分毎に PBS の濁度を 630nm の波長で吸光度を測定し PBS 分解率を算出した(図28)。結果として PBS 分解率に有意な差が確認されたため、PBS 乳化液中でのRol Aによる  
20 PBS 分解促進効果が認められた。

(15-3)クチナーゼによるPBSフィルムの分解に対するPbpAの分解促進効果  
PbpAは硫酸アンモニウム30%以上の水分活性の低い状態条件でPBSに吸着する。そこでPBSフィルム上でPbpAを乾燥させることで水分活性を下げ、PbpA  
25 がPBSに吸着している状態でクチナーゼによるPBS分解を試みた。

PbpAの精製標品を精製水で希釈し、1.0、5.0、10、50、100 ( $\mu$ g/ml) の濃度に調整した。それぞれの濃度のPbpA溶液10  $\mu$ lをPBSフィルム上にスポットし37

℃にて完全に乾燥させPbpAのPBSに対する吸着を促した。PBSフィルム上に吸着したPbpA状に直径6 mmの濾紙を静置し、10  $\mu$ lのクチナーゼ溶液(20  $\mu$ g/ml)をしみ込ませた。この状態のPBSフィルムを37℃で6時間保温しPBSフィルムの分解を観察した。

5

反応後のPBSフィルムを観察したところ、100、50 ( $\mu$ g/ml)のPbpAをスポットした部分では濾紙を静置した部分全体に有為なPBSの分解が観察された(図29)。そして10、5.0 ( $\mu$ g/ml)のPbpAをスポットした部分では、10  $\mu$ lのPbpA溶液をスポットした部分にのみ有為な分解が観察された。したがって、PbpAがPBSに吸着した場合においてより有効にクチナーゼの分解が促進されることが明らかになった。

10

(15-4) クチナーゼによるPBSフィルムの分解に対するハイドロホービン及びPbpAと人工界面活性剤との分解促進効果の比較

15

実施例15-1、15-3においてハイドロホービンとPbpAがクチナーゼによるPBSを促進することが確認された。これらのバイオサーファクタントが人工界面活性剤と比較した場合に有意に促進効果を示すかどうかを検討した。本実験では人工界面活性剤としてプライサーフA210G(第一工業製薬)を用いた。

20

実施例15-1、15-3において促進効果が観察された濃度(ハイドロホービン: 2.5  $\mu$ g/ml、PbpA: 10  $\mu$ g/ml)のバイオサーファクタントをPBSのフィルム上に実施例15-1、15-3の方法に従って吸着させた。また、同様に2.5  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/mlのプライサーフA210GをPBSフィルム上に吸着させた。このとき界面活性成分を含まないコントロールとしてハイドロホービンの場合は10mM Tris-HClバッファー(pH 8.0)を、そしてPbpAの場合は精製水を用い、同様に吸着処理を行った。吸着しているバイオサーファクタントとプライサーフA210Gを被うように直径6mmの濾紙を静置し、10mM Tris-HCl バッファー(pH 8.0)に溶解している10  $\mu$ lのクチナーゼ溶液(20  $\mu$ g/ml)をしみ込ませた。このPBSフィルムを実施例15-1

25

、15-3に記載されている条件で反応を行った(ハイドロホービン: 30°Cにて12時間、PbpA: 37°Cにて6時間)。反応後のPBSフィルムを精製水で洗浄後、乾燥させた後に観察を行った。

- 5      その結果、PBSフィルム状の両バイオサーファクタントを吸着させた部位はコントロールと比較してPBSが有意に分解されていた(図30)。そしてプライサーフA210Gを吸着させた部位においては、コントロールと比較した場合に有意なPBSの分解は観察されなかった(図30)。尚、PBSのフィルムを透過画像として取り込んだので、図30においてPBS分解部分は黒色で表されている。このことから
- 10      ハイドロホービンやPbpAといったバイオサーファクタントはプライサーフA210Gのような人工界面活性剤よりも強力にクチナーゼのPBS分解を促進することが明らかになった。

#### 産業上の利用可能性

15

本発明はプラスチック結合性タンパク質等のバイオサーファクタントがプラスチックの疎水表面に吸着し、それによって、プラスチック分解酵素と共同してプラスチックの分解を有効に促進することができる、という新たな知見に基づくものである。

20

- 従って、本発明においては、バイオサーファクタントの存在下でプラスチックをより効果的に分解する方法が提供される。更に、バイオサーファクタントとプラスチック分解酵素を生産する微生物、或いは、あるいはバイオサーファクタント及び／又はプラスチック分解酵素そのものを活用することで、高密度のプラスチックの大規模分解を効率的に進行させることが可能となり、更に、酵素タンパク質や抗生物質などの有用物質生産性の高い微生物(糸状菌や放線菌)を用いることによって、有用物質の生産も同時に行うことができる新規な方法を提供することが出来る。
- 25

## 請求の範囲

1. バイオサーファクタントの存在下でプラスチックを分解する方法。
2. バイオサーファクタントがプラスチック結合性タンパク質である、請求項1記載の方法。
3. プラスチック分解酵素を用いてプラスチックを分解する、請求項1又は2記載の方法。
4. バイオサーファクタントがプラスチックに効果的に吸着するように両者間の疎水的相互作用が強まるような条件下でバイオサーファクタントをプラスチックと混合することを含む、請求項1、2又は3記載の方法。
5. 低水分活性状態でバイオサーファクタントをプラスチックと混合するステップ、高水分活性状態でプラスチック分解酵素によりプラスチックを分解するステップからなる、請求項4記載のプラスチックの分解法。
6. 高塩濃度状態でバイオサーファクタントをプラスチックと混合するステップ、低塩濃度状態でプラスチック分解酵素によりプラスチックを分解するステップからなる、請求項5記載のプラスチックの分解法。
7. プラスチックにアスペルギルス・オリゼ又はアスペルギルス・ソーヤを接触させ、アスペルギルス・オリゼ又はアスペルギルス・ソーヤがその場で産生するバイオサーファクタント及びプラスチック分解酵素の作用によりプラスチックを分解することから成る、請求項1ないし6のいずれか一項に記載の方法。
8. プラスチックに微生物を接触させ、微生物の作用によりプラスチックを分解し、更に、分解されたプラスチックの成分を微生物により有用物質に転換することから成る、プラスチックから有用物質を製造する方法。
9. 有用物質が、タンパク質、一次代謝産物、二次代謝産物、及びバイオサーファクタントから成る群から選択されることを特徴とする請求項8に記載の方法。
10. 有用物質が菌体外に分泌される物質であることを特徴とする、請求項8ないし9のいずれか一項に記載の方法。

11. 有用物質の生合成系に關与する酵素をコードする遺伝子によって組換えられ、該酵素を高発現する形質転換菌を使用することを特徴とする、請求項8ないし10のいずれか一項に記載の方法。
12. 界面活性物質及び／又はプラスチック分解酵素を共存させることにより、  
5 プラスチックの分解を促進することを特徴とする、請求項7ないし11のいずれか一項に記載の方法。
13. 界面活性物質及び／又はプラスチック分解酵素を反応系の外部より添加して、プラスチックの分解を促進することを特徴とする、請求項12に記載の方法。
- 10 14. バイオサーファクタント及び／又はプラスチック分解酵素をコードする遺伝子によって組換えられ、界面活性物質及び／又はプラスチック分解酵素を高発現する形質転換菌を使用することを特徴とする、請求項12又は13に記載の方法。
15. バイオサーファクタント及び／又はプラスチック分解酵素をコードする遺伝  
15 子が構成的発現プロモーターの制御下にあることを特徴とする、請求項14に記載の方法。
16. バイオサーファクタント及び／又はプラスチック分解酵素をコードする遺伝子が誘導型発現プロモーターの制御下にあることを特徴とする、請求項14に記載の方法。
- 20 17. 界面活性物質としてバイオサーファクタントを用いることを特徴とする、請求項12ないし13のいずれか一項に記載の方法。
18. バイオサーファクタント及び／又はプラスチック分解酵素の共存下で、プラスチックに微生物を接触させ、微生物の作用によりプラスチックを分解することから成る、プラスチックを分解する方法。
- 25 19. バイオサーファクタント及び／又はプラスチック分解酵素を反応系の外部より添加して、プラスチックの分解を促進することを特徴とする、請求項18に記載の方法。
20. バイオサーファクタント及び／又はプラスチック分解酵素をコードする遺伝

子によって組換えられ、バイオサーファクタント及び／又はプラスチック分解酵素を高発現する形質転換菌を使用することを特徴とする、請求項18又は19に記載の方法。

5 21. バイオサーファクタント及び／又はプラスチック分解酵素をコードする遺伝子を構成的発現プロモーターの制御下で発現させることを特徴とする、請求項20に記載の方法。

22. バイオサーファクタント及び／又はプラスチック分解酵素をコードする遺伝子を誘導型発現プロモーターの制御下で発現させることを特徴とする、請求項20に記載の方法。

10 23. アスペルギルス属カビ由来のバイオサーファクタント及び／又はプラスチック分解酵素を用いることを特徴とする、請求項18ないし22のいずれか一項に記載の方法。

24. アスペルギルス属カビがアスペルギルス・オリゼであることを特徴とする、請求項23に記載の方法。

15 25. プラスチック分解酵素がエステラーゼ、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、リパーゼ、クチナーゼ、セリンハイドロラーゼ、及びそれらの混合物から成る群から選択されることを特徴とする、請求項18ないし24のいずれか一項に記載の方法。

20 26. バイオサーファクタントとしてハイドロホービン、プラスチック分解酵素としてクチナーゼを用いることを特徴とする、請求項18ないし25のいずれか一項に記載の方法。

27. プラスチックが生分解性プラスチックである、請求項7ないし26のいずれか一項に記載の方法。

25 28. プラスチックがポリエステル、ポリウレタン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニール、ナイロン、ポリスチレン、デンプン、及びそれらの混合物から成る群から選択されることを特徴とする、請求項27に記載の方法。

29. ポリエステルがポリブチレンサクシネート、ポリ乳酸、ポリブチルサクシネート・アジペート、脂肪族ポリエステル、及びポリカプロラクトンから成る群から選

択されることを特徴とする、請求項28記載の方法。

30. 微生物が糸状性細菌であることを特徴とする、請求項7ないし29のいずれか一項に記載の方法。

31. 糸状性細菌が放線菌であることを特徴とする、請求項30に記載の方法。  
5

32. 放線菌がストレプトマイセス属であることを特徴とする、請求項31に記載の方法。

33. ストレプトマイセス属がストレプトマイセス・グリゼウスまたはストレプトマイセス・セリカラーであることを特徴とする、請求項32に記載の方法。

10 34. 微生物が真核糸状真菌であることを特徴とする、請求項7ないし29のいずれか一項に記載の方法。

35. 真核糸状真菌がアスペルギルス属、ペニシリウム属、トリコデルマ属、リゾプス属、マグナポルサ属、メタリチウム属、ノイロスポラ属、モナスカス属、アクレモニウム属及びムコール属から成る群から選択されることを特徴とする、請求項  
15 34に記載の方法。

36. アスペルギルス属微生物が、アスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・ソーヤ、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・アワモリ、アスペルギルス・カワチ、アスペルギルス・ニドゥランス、アスペルギルス・タマリ及びアスペルギルス・レペンスから成る群から選択されることを特徴とする、請求項35に記載の方法。

20 37. 液体培養系において、プラスチックに微生物を接触させることを特徴とする、請求項7ないし36のいずれか一項に記載の分解方法。

38. 固体培養系において、プラスチックにアスペルギルス・オリゼを接触させることを特徴とする、請求項7ないし36のいずれか一項に記載の分解方法。

25 39. 界面活性物質をコードする遺伝子を含むDNA、プラスチック分解酵素をコードする遺伝子を含むDNA、及び有用物質をコードする遺伝子を含むDNAから選択される少なくとも一つ以上のDNAによって組換えられた形質転換菌。

40. 界面活性物質がアスペルギルス・オリゼ由来のハイドロホービンである、請求項39記載の形質転換菌。



41. プラスチック分解酵素がアスペルギルス・オリゼ由来のクチナーゼである、請求項39記載の形質転換菌。
42. 界面活性物質がアスペルギルス・オリゼ由来のハイドロホービンであり、プラスチック分解酵素がアスペルギルス・オリゼ由来のクチナーゼであり、且つ、
- 5 有用物質が $\alpha$ -アミラーゼである、請求項39記載の形質転換菌。
43. アスペルギルス属微生物である、請求項39ないし42のいずれか一項に記載の形質転換菌。
44. アスペルギルス・オリゼ由来であることを特徴とする、請求項43に記載の形質転換菌。
- 10 45. プラスチックが複合材料の一構成要素として含まれている、請求項1ないし38のいずれか一項に記載の方法。
46. 以下の(a)又は(b)ポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA:
- 15 (a)配列番号:3で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- (b)(a)で示されるアミノ酸配列において、一部のアミノ酸が欠失、置換、又は付加されたアミノ酸配列からなりハイドロホービンと実質的に同等の機能を有するポリペプチド。
- 20 47. 以下の(a)又は(b)のDNA:
- (a)配列番号:3で示される塩基配列又はその部分配列を含むDNA、
- (b)(a)の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、(a)のDNAと実質的に同等の機能を有するDNA。
- 25 48. 以下の(a)又は(b)ポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA:
- (a)配列番号:4又は5で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- (b)(a)で示されるアミノ酸配列において、一部のアミノ酸が欠失、置換、

又は付加されたアミノ酸配列からなりプラスチック分解酵素と実質的に同等の機能を有するポリペプチド。

49. 以下の(a)又は(b)のDNA:

(a)配列番号:4又は5で示される塩基配列又はその部分配列を含むDN

5 A、

(b)(a)の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、(a)のDNAと実質的に同等の機能を有するDNA。

50. 以下の(a)又は(b)ポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA:

10 (a)配列番号:6又は7で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(b)(a)で示されるアミノ酸配列において、一部のアミノ酸が欠失、置換、又は付加されたアミノ酸配列からなりプラスチック結合性タンパク質と実質的に同等の機能を有するポリペプチド。

15 51. 以下の(a)又は(b)のDNA:

(a)配列番号:6又は7で示される塩基配列又はその部分配列を含むDN

A、

(b)(a)の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、(a)のDNAと実質的に同等の機能を有するDNA。

20

52. 請求項46ないし51のいずれか一項に記載の遺伝子によりコードされるタンパク質。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11861

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C08J11/10, C08J11/18, B29B17/00, C12N1/00, C12N1/15, C12N9/30, C12N15/55// (C12N1/00, C12R1:456, C12R1:66, C12R1:685, C12R1:69), (C12N9/30, C12R1:465,

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C08J11/10, C08J11/18, B29B17/00, C12N1/00, C12N1/15, C12N9/30, C12N15/55// (C12N1/00, C12R1:456, C12R1:66, C12R1:685, C12R1:69), (C12N9/30, C12R1:465,

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98/36086 A1 (BAYER AG.), 20 August, 1998 (20.08.98), & DE 19706023 A1 & AU 9860993 A & EP 968300 A1 & US 6255451 B1 & AU 734738 B & JP 2001-512504 A & NZ 337239 A	1-38, 45
Y	Tetsuya DEGUCHI, "Lignin Bunkaikin (IZU-154 Kabu) ni yoru Nylon oyobi Polyethylene no Seibunkai", Polymer Preprints, Japan, 1993, Vol.42, No.2, page 427	1-38, 45
Y	JP 52-82773 A (AGENCY OF IND.SCI. & TECHNOLOGY), 11 July, 1977 (11.07.77), & JP 54-44749 B	1-38, 45

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
15 December, 2003 (15.12.03)

Date of mailing of the international search report  
13 January, 2004 (13.01.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11861

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01/14524 A1 (BE ABLE KABUSHIKI KAISHA), 01 March, 2001 (01.03.01), & JP 2001-61468 A	1-38,45
Y	JP 10-96174 A (NAGASE SEIKAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA), 14 April, 1998 (14.04.98), (Family: none)	1-38,45
Y	JP 11-216355 A (STM ENG. KABUSHIKI KAISHA), 10 August, 1999 (10.08.99), (Family: none)	1-38,45
Y	JP 10-306098 A (BE ABLE KABUSHIKI KAISHA), 17 November, 1998 (17.11.98), (Family: none)	1-38,45
Y	Zangi R. et al., Molecular dynamics study of the folding of hydrophobin SC3 at a hydrophilic/ hydrophobic interface., Biophys J., 2002, Vol.83, No.1, p.112-24	12-38,45
Y	Lugones LG. et al., A hydrophobin (ABH3) specifically secreted by vegetatively growing hyphae of Agaricus bisporus (common white button mushroom)., Microbiology., 1998, Vol.144, Pt:8, p.2345-53	12-38,45
Y	Wosten H. et al., Interfacial self-assembly of a fungal hydrophobin into a hydrophobic rodlet layer., Plant Cell., 1993, Vol.5, No.11, pages 1567 to 1574	12-38,45
Y	Stringer MA. et al., dewA encodes a fungal hydrophobin component of the Aspergillus spore wall., Mol.Microbiol., 1995, Vol.16, No.1, pages 33 to 44	12-38,45
Y	Parta M. et al., HYP1, a hydrophobin gene from Aspergillus fumigatus, complements the rodletless phenotype in Aspergillus nidulans., Infect.Immun., 1994, Vol.62, No.10, p.4389-95	12-38,45

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11861

## Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (International Patent Classification (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C12R1:66, C12R1:685, C12R1:69), (C12N15/09, C12R1:69)

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

## Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched (International Patent Classification (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C12R1:66, C12R1:685, C12R1:69), (C12N15/09, C12R1:69)

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11861

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1 to 38, 45

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet(1)

The inventions according to claims 1 to 38 and 45 relate to a method of degrading a plastic by contacting the plastic with a microorganism in the presence of a biosurfactant and/or a plastic-degrading enzyme and degrading the plastic under the action of the microorganism. The inventions according to claims 39 to 44 relate to transformant microorganisms having a gene encoding a biosurfactant; a plastic-degrading enzyme, etc. transferred thereinto. The inventions according to claims 46, 47 and 52 relate to a hydrophobin protein which is a biosurfactant and a DNA encoding this protein. The inventions according to SEQ ID NOS:4 and 5 in claims 48, 49 and 52 relate to DNAs encoding a plastic-degrading enzyme and the protein. The inventions according to SEQ ID NOS: 6 and 7 in claims 50 to 52 relate to a plastic-binding protein which is a biosurfactant and a DNA encoding this protein.

Although the relationships between a base sequence and a protein encoded thereof of SEQ ID NOS:4 and 5 and SEQ ID NOS:6 and 7 each complies with the requirement of unity of invention, there is no chemical structure common to SEQ ID NOS:4 and 5 or SEQ ID NOS:6 and 7. Since the gene sequences of the hydrophobin which is a biosurfactant, the plastic-binding protein and the plastic-degrading enzyme are publicly known (see the following documents), provision of the gene data thereof cannot be considered as a special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.2.

Degradation of a plastic by contacting the plastic with a microorganism in the presence of a biosurfactant or a plastic-degrading enzyme was already a well known technique on the priority date of the present application.

Such being the case, the inventions according to claims 1 to 38 and 45, claims 39 to 44, claims 46, 47 and 52 and SEQ ID NOS:4 and 5 in claims 48, 49 and 52 and SEQ ID NOS:6 and 7 in claims 50 to 52 are not considered as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept but 7 groups of inventions.

## Document

1. Lugones LG et al, A hydrophobin (ABHs) specifically secreted by vegetatively growing hyphae of *Agaricus bisporus* (common white button mushroom)., *Microbiology.*, 1998, Vol.144, Pt 8, p.2345-53.
2. Kakudo S et al, Nylon oligomer degradation gene, *nylC*, on plasmid pOAD2 from *Flavobacterium* strain encodes endo-type 6-aminohexanoate oligomer hydrolase: purification and characterization of the *nylC* gene product., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, Vol.59, No.11, p.3978-80.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int Cl<sup>1</sup> C12N15/09, C08J11/10, C08J11/18, B29B17/00, C12N1/00, C12N1/15, C12N9/30, C12N15/55 //  
(C12N1/00, C12R1:465, C12R1:66, C12R1:685, C12R1:69), (C12N9/30, C12R1:465, C12R1:66, C12R1:685, C12R1:69),  
(C12N15/09, C12R1:69)

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int Cl<sup>1</sup> C12N15/09, C08J11/10, C08J11/18, B29B17/00, C12N1/00, C12N1/15, C12N9/30, C12N15/55 //  
(C12N1/00, C12R1:465, C12R1:66, C12R1:685, C12R1:69), (C12N9/30, C12R1:465, C12R1:66, C12R1:685, C12R1:69),  
(C12N15/09, C12R1:69)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

B I O S I S (D I A L O G), W P I (D I A L O G), J S T P l u s (J O I S)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 98/36086 A1 (BAYER AG) 1998. 08. 20 &DE 19706023 A1 &AU 9860993 A &EP 968300 A1 &US 6255451 B1 &AU 734738 B &JP 2001-512504 A &NZ 337239 A	1-38, 45
Y	出口哲也, リグニン分解菌 (IZU-154株) によるナイロンおよびポリ リエチレンの生分解, 高分子学会予稿集, 1993, Vol. 42, No. 2, p. 427	1-38, 45
Y	JP 52-82773 A (AGENCY OF IND SCI&TECHNOLOGY) 1977. 07. 11 &JP 54-44749 B	1-38, 45

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 5 . 1 2 . 0 3

国際調査報告の発送日

13.01.04

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

4 B

9 7 3 5

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 01/14524 A1 (BE ABLE KK) 2001. 03. 01 &JP 2001-61468 A	1-38, 45
Y	JP 10-96174 A (NAGASE SEIKAGAKU KOGYO KK) 1998. 04. 14 ファミリー無し	1-38, 45
Y	JP 11-216355 A (STM ENG KK) 1999. 08. 10 ファミリー無し	1-38, 45
Y	JP 10-306098 A (BE ABLE KK) 1998. 11. 17 ファミリー無し	1-38, 45
Y	Zangi R et al, Molecular dynamics study of the folding of hydrophobin SC3 at a hydrophilic/hydrophobic interface., Biophys J., 2002 , Vol. 83, No. 1, p. 112-24.	12-38, 45
Y	Lugones LG et al, A hydrophobin (ABH3) specifically secreted by vegetatively growing hyphae of <i>Agaricus bisporus</i> (common white button mushroom)., Microbiology., 1998 , Vol. 144, Pt 8, p. 2345-53.	12-38, 45
Y	Wosten H et al, Interfacial self-assembly of a fungal hydrophobin into a hydrophobic rodlet layer., Plant Cell., 1993 , Vol. 5, No. 11, p. 1567-1574.	12-38, 45
Y	Stringer MA et al, <i>dewA</i> encodes a fungal hydrophobin component of the <i>Aspergillus</i> spore wall., Mol Microbiol., 1995 , Vol. 16, No. 1, p. 33-44.	12-38, 45
Y	Parta M et al, <i>HYPI</i> , a hydrophobin gene from <i>Aspergillus fumigatus</i> , complements the <i>rodletless</i> phenotype in <i>Aspergillus nidulans</i> ., Infect Immun., 1994 , Vol. 62, No. 10, p. 4389-95.	12-38, 45

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

別紙参照。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲 1-38, 45

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## 第 I I 欄 別紙

請求の範囲 1 乃至 38、45 はバイオサーファクタント及び／又はプラスチック分解酵素の存在下でプラスチックに微生物を接触させ、微生物の作用によりプラスチックを分解する方法についての発明であり、請求の範囲 39 乃至 44 はバイオサーファクタント、プラスチック分解酵素等をコードする遺伝子を導入した形質転換菌の発明、請求の範囲 46、47、52 はバイオサーファクタントであるヒドロホービン蛋白質及び該蛋白質をコードする DNA の発明、請求の範囲 48、49、52 の配列番号 4 及び 5 はプラスチック分解酵素及び該蛋白質をコードする DNA の発明、請求の範囲 50 乃至 52 の配列番号 6 及び 7 はバイオサーファクタントであるプラスチック結合蛋白質及び該蛋白質をコードする DNA の発明である。

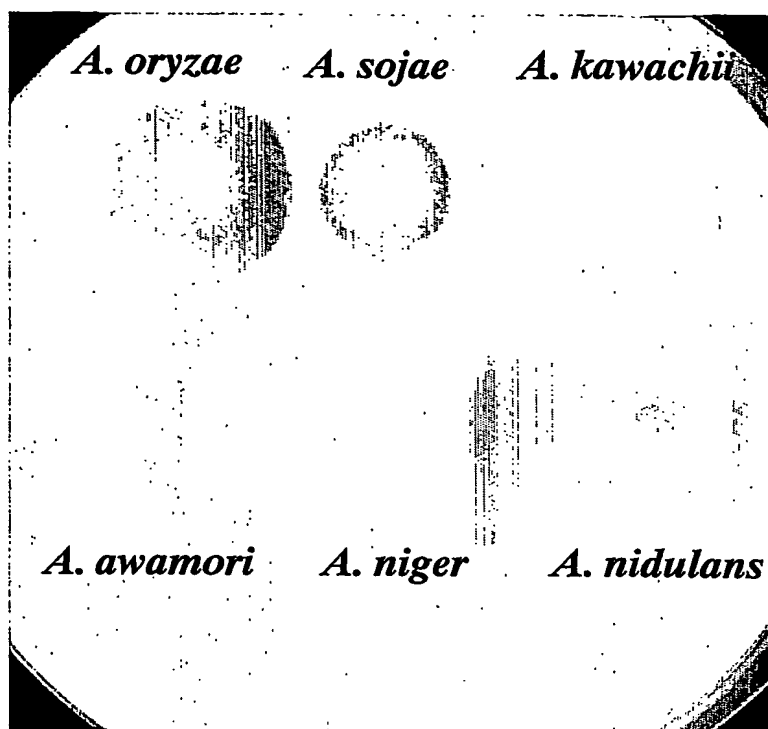
ここで、配列番号 4 及び 5、あるいは配列番号 6 及び 7 の塩基配列とそれがコードする蛋白質との関係においてはそれぞれ発明の単一性を満たすものの、配列番号 4 及び 5、あるいは配列番号 6 及び 7 の間に共通の化学構造は存在しない。そして、バイオサーファクタントの一種であるヒドロホービン、プラスチック結合蛋白質及びプラスチック分解酵素の遺伝子配列は公知であるから（下記文献参照）、これらの遺伝情報を提供することは PCT 規則 13.2 における特別な技術的特徴であるとはいえない。

また、バイオサーファクタントあるいはプラスチック分解酵素の存在下でプラスチックに微生物を接触させプラスチックを分解することは本願優先日当時周知の技術である。

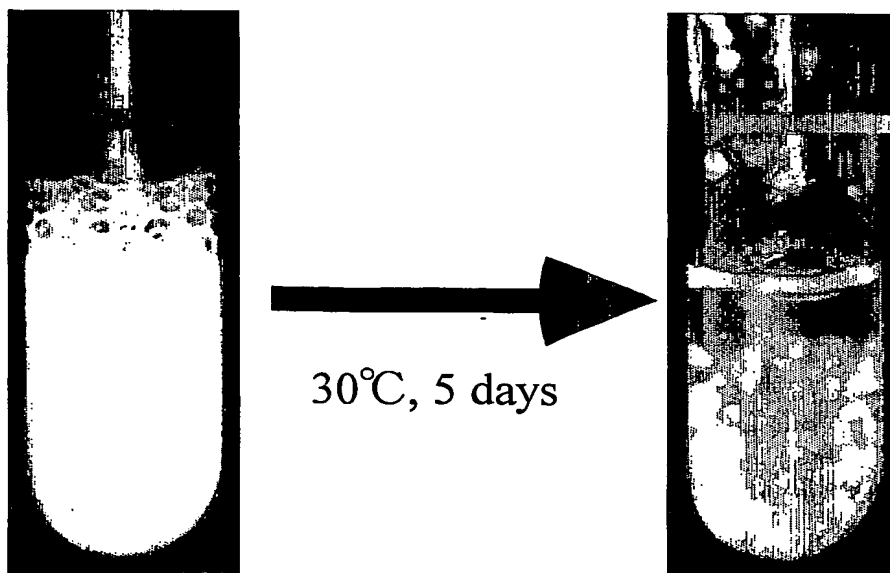
よって、請求の範囲 1 乃至 38、45 と 39 乃至 44 と 46、47、52 と請求の範囲 48、49、52 の配列番号 4 及び 5 と請求の範囲 50 乃至 52 の配列番号 6 及び 7 は単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められず、7 個の発明からなる発明群であると認める。

## 文献

1. Lugones LG et al, A hydrophobin (ABH3) specifically secreted by vegetatively growing hyphae of *Agaricus bisporus* (common white button mushroom)., *Microbiology.*, 1998, Vol. 144, Pt 8, p. 2345-53.
2. Kakudo S et al, Nylon oligomer degradation gene, *nylC*, on plasmid pOAD2 from a *Flavobacterium* strain encodes endo-type 6-aminohexanoate oligomer hydrolase: purification and characterization of the *nylC* gene product., *Appl Environ Microbiol.*, 1993, Vol. 59, No. 11, p. 3978-80.



(A) PBS エマルジョン最少寒天培地上でのHalo 形成

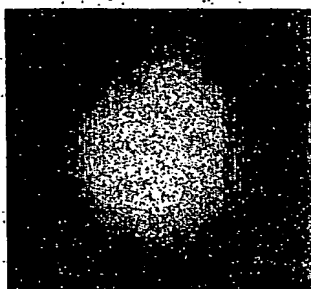


(B) PBS最少液体培地の濁度低下

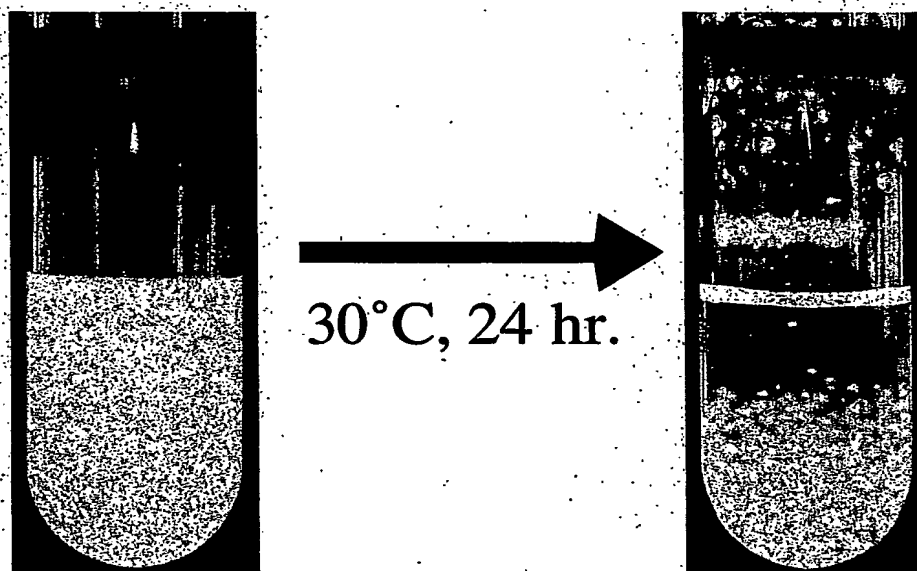
FIG. 1

差替え用紙 (規則26)

2 / 28



(A) PLA エマルジョン最少寒天培地上での Halo 形成



(B) PLA 最少液体培地の濁度低下

FIG. 2

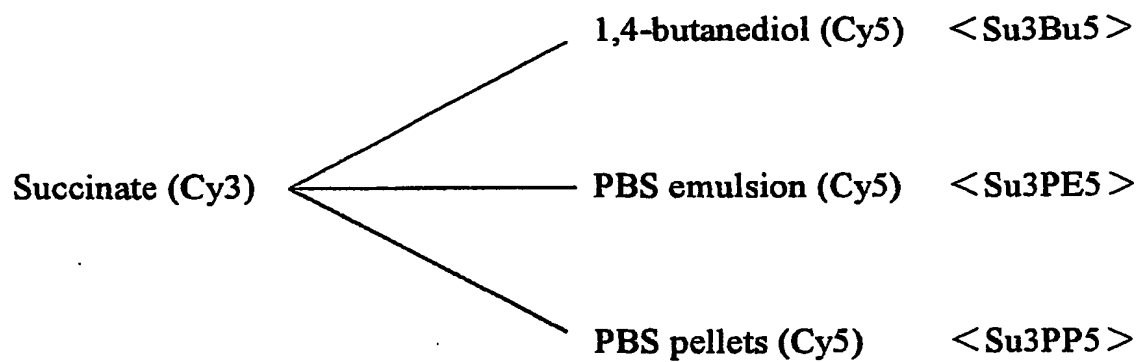


FIG. 3

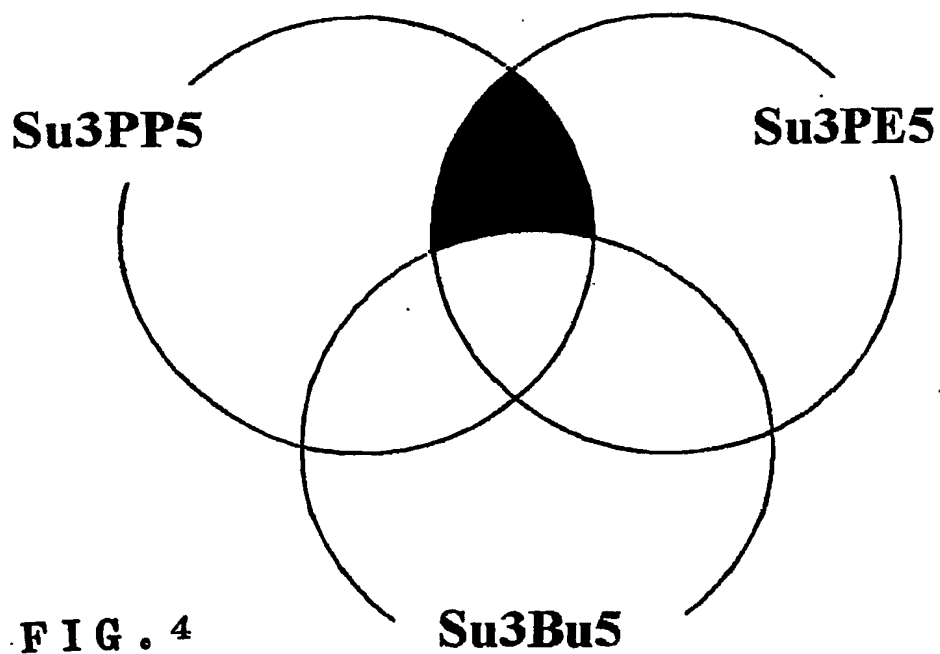


FIG. 4

4 / 28







GENE	Su3PP5	Su3PE5	Su3Bu5
JZ3981 hydrophobin	 9.11	 18.0	 1.27
Histone	 0.86	 1.01	 1.03

FIG. 5

5/28

CCAGAACATTGGCTGCCCTAGTCTGTGCACTGAACACACGCTCATTCACCTCTTCACAGTTCAGTCTCTCTCCAAAG

ACAAAGCTTCTCTCGCTTACAAACTTCTCCGAGTCTACCCCTCGTTCAAAACCAAGCCACCATCACAAATGCAGTTTC  
M Q FTCCGTGCCGCTGTTCTTGTCTGTGGTACTGCCGTTGCCGCTCTTCCTCTGCTCTCTGGCACTGGCCGCTGGCCAG  
S V A A V L A L A T A V A A L P A S G T G A G QCAAGTCGGACACTCCAAGAACGACTTCCCTCTCCCTAAGAGTTGACCACCAAGCAGGCCGCCGACAAAGTGTGGT  
Q V G H S K N D F P L P K E L T T K Q A A D K C GGACCAGGCTCAGCTCACCTGCTGCAACAAGACCGTCAAGACCGGTGACTTCAACCCAGGTTGAGGAGGGTCTCCTT  
D Q A Q L T C C N K T V K T G D F T Q V E G L LGCTGGCCTCCTCTCCAACCTCCTCGGTGCCGACAGGGCTCCAGGGTCTTGGTCTCTTGGATGAGTGCAACCAAC  
A G L L S N L L G A G Q G S Q G L L D E C T NATCCCTGTATACCCCATCATCTCCATCGCCTCTCCTCAGGAGAAAGTGCAAGCAGCCCATCTCTTGTGTCAGAAC  
I P V I P I I S I A S P Q E K C K Q P I S C C Q NACCAAGTCCAGCGCGATGGCGACCTCTGTCGGTATTTGGTCTTCTTGCATCGCTCTCGGCTCTCTCTCTGTAAAGCG  
T K S S A D G D L V G I G L P C I A L G S L L \*

ATTGCATTGGCGAAATGGTAGCTCGAGGAGCACGGGA

F  
H  
G  
•  
6



6/28

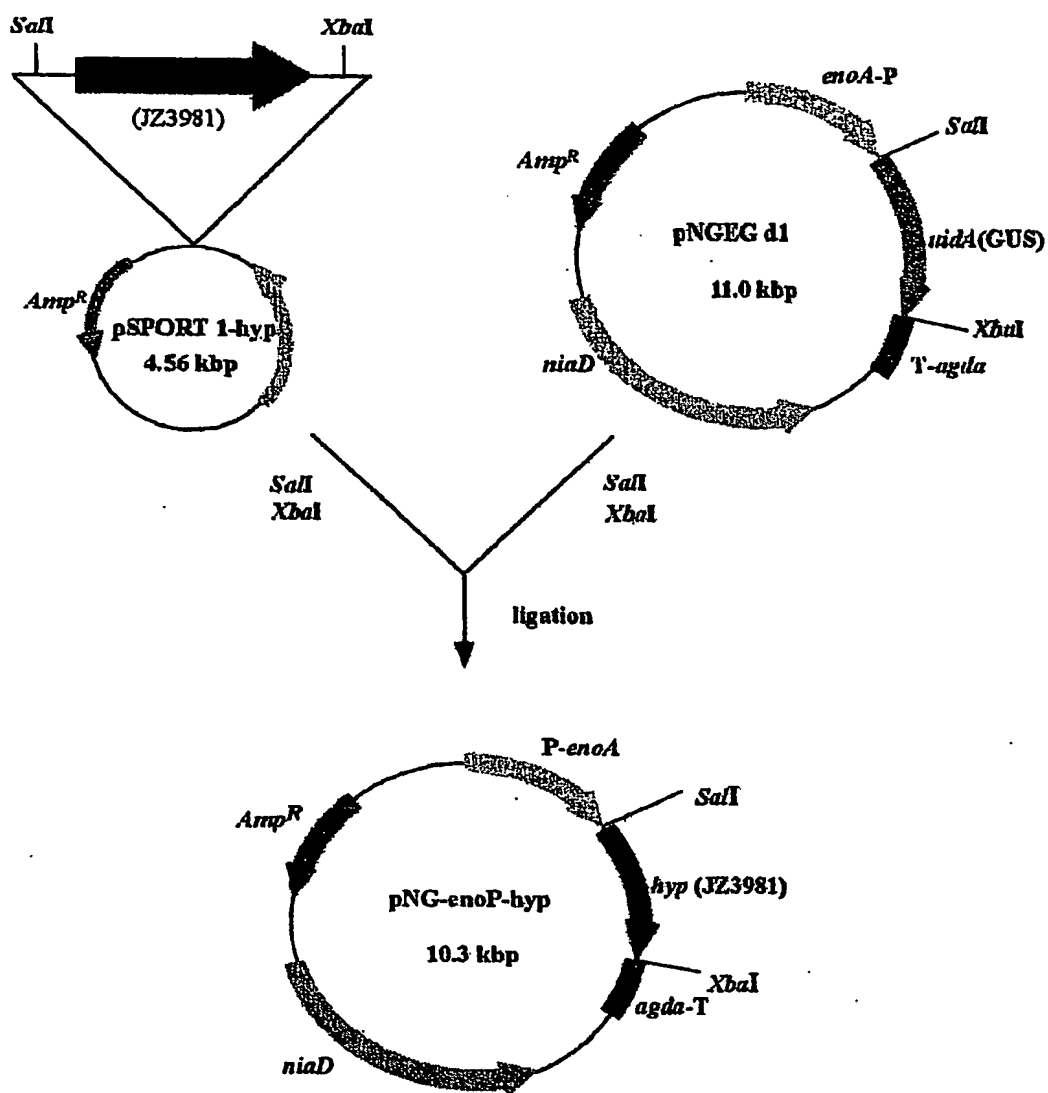


FIG. 7

7 / 28

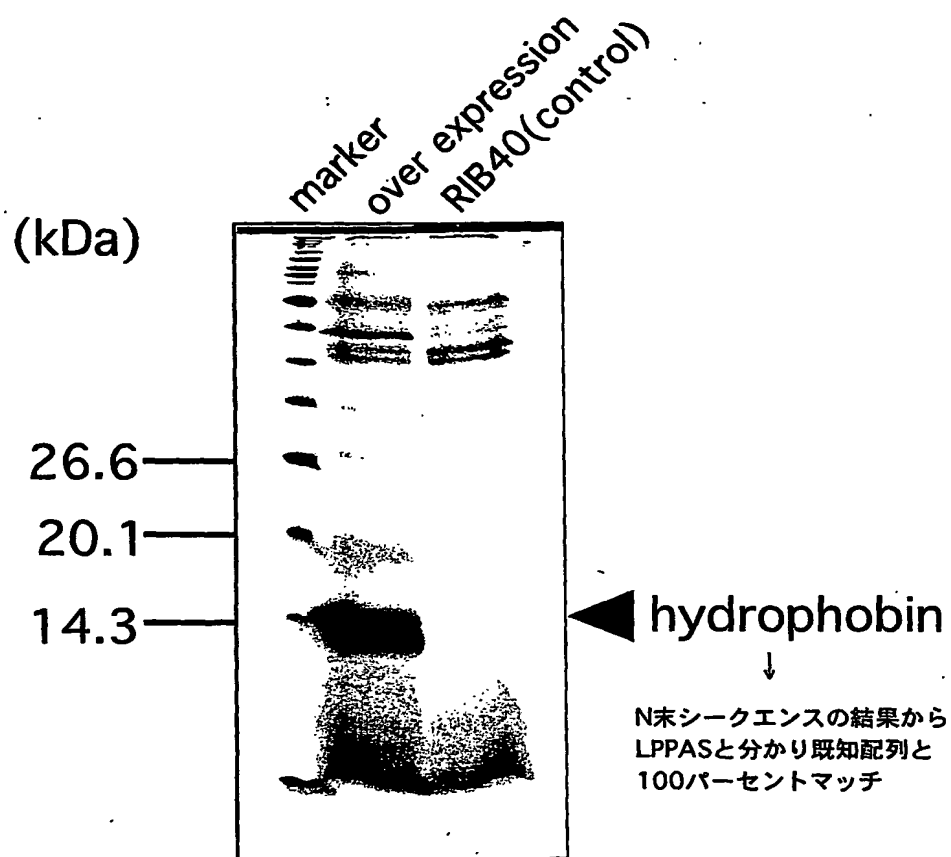
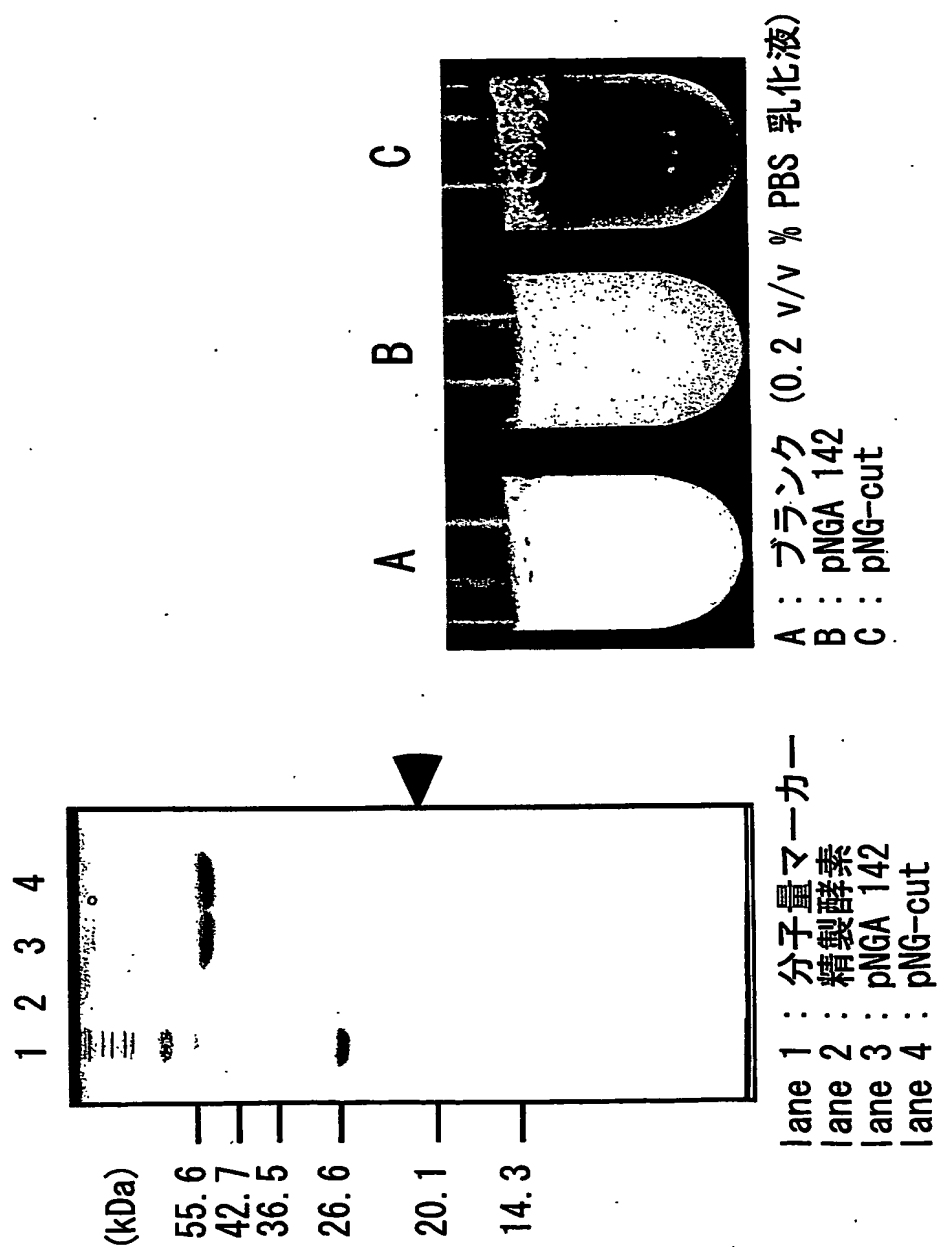


FIG. 8



PBS 分解活性の検定

SDS-PAGE

FIG. 9

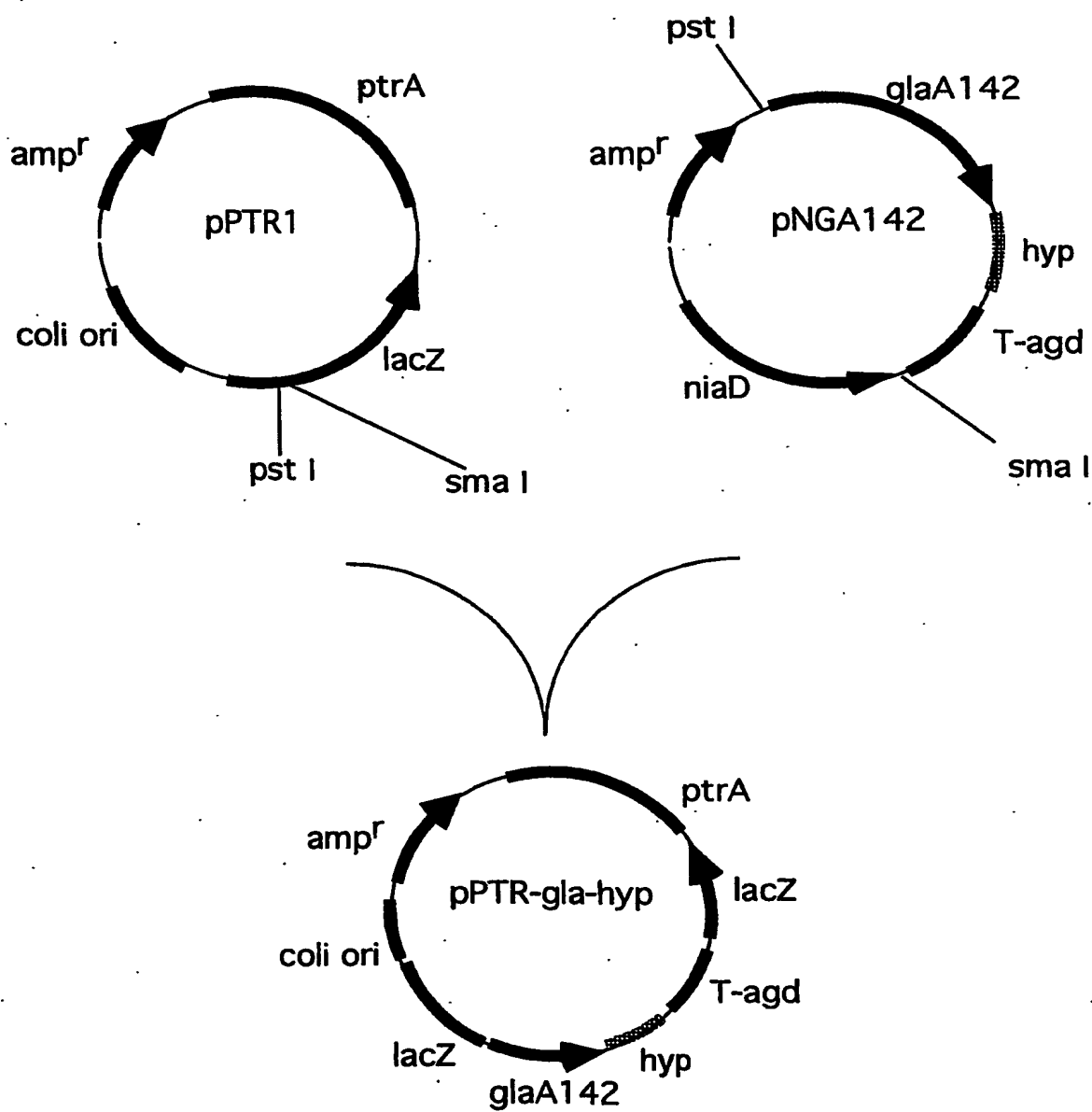


FIG. 10

10/28

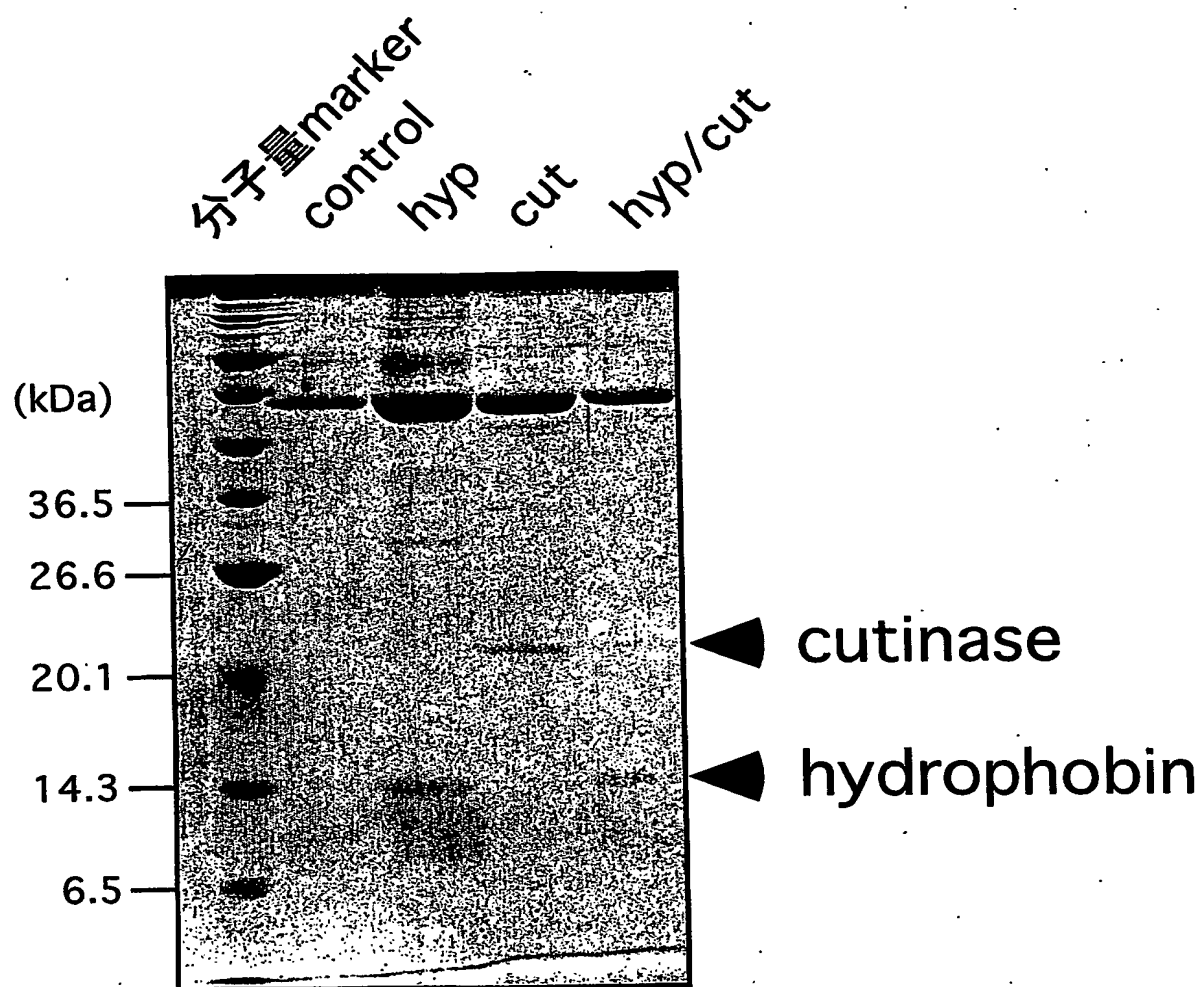


FIG. 11

11/28

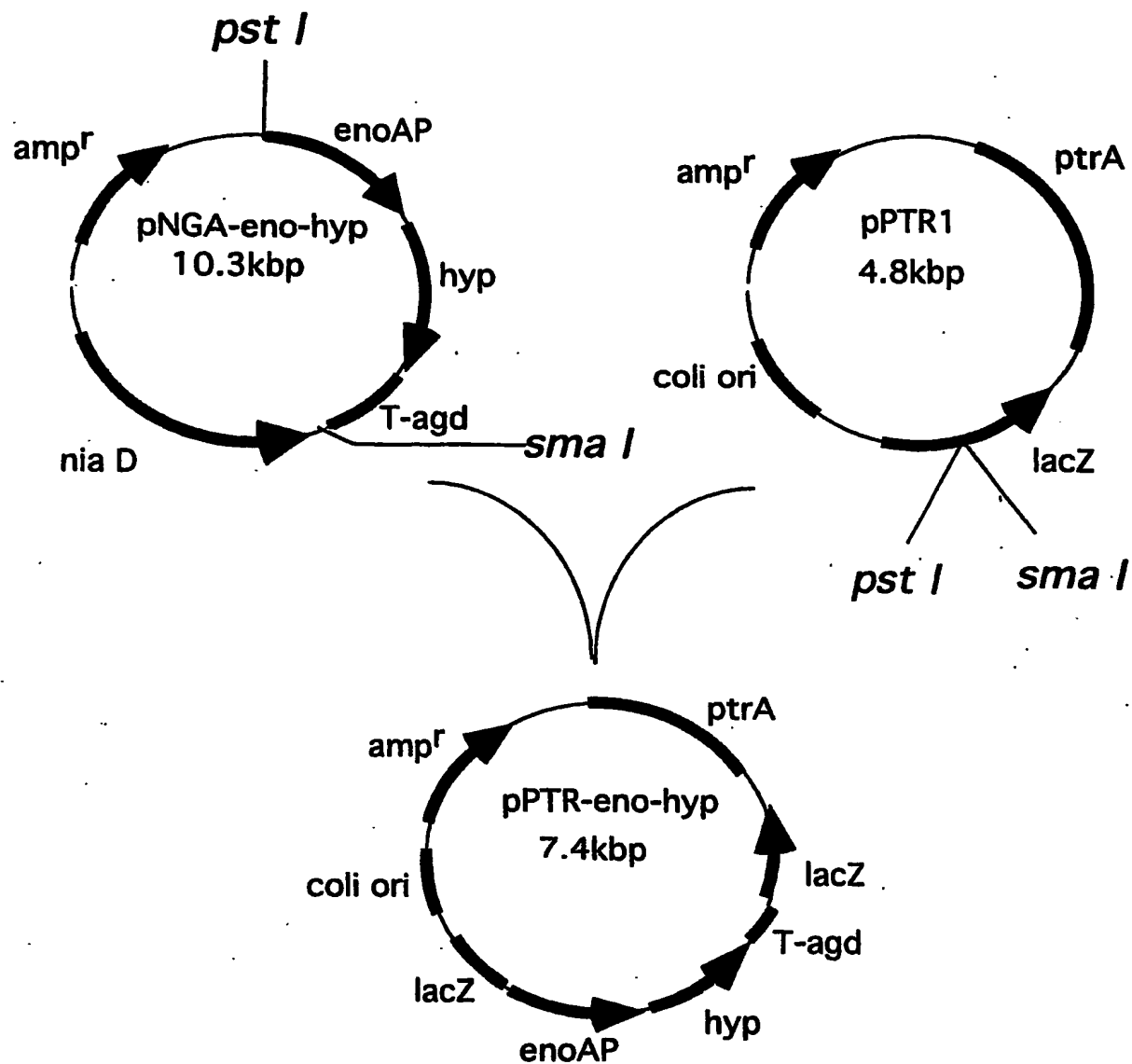


FIG. 12

1 2/2 8

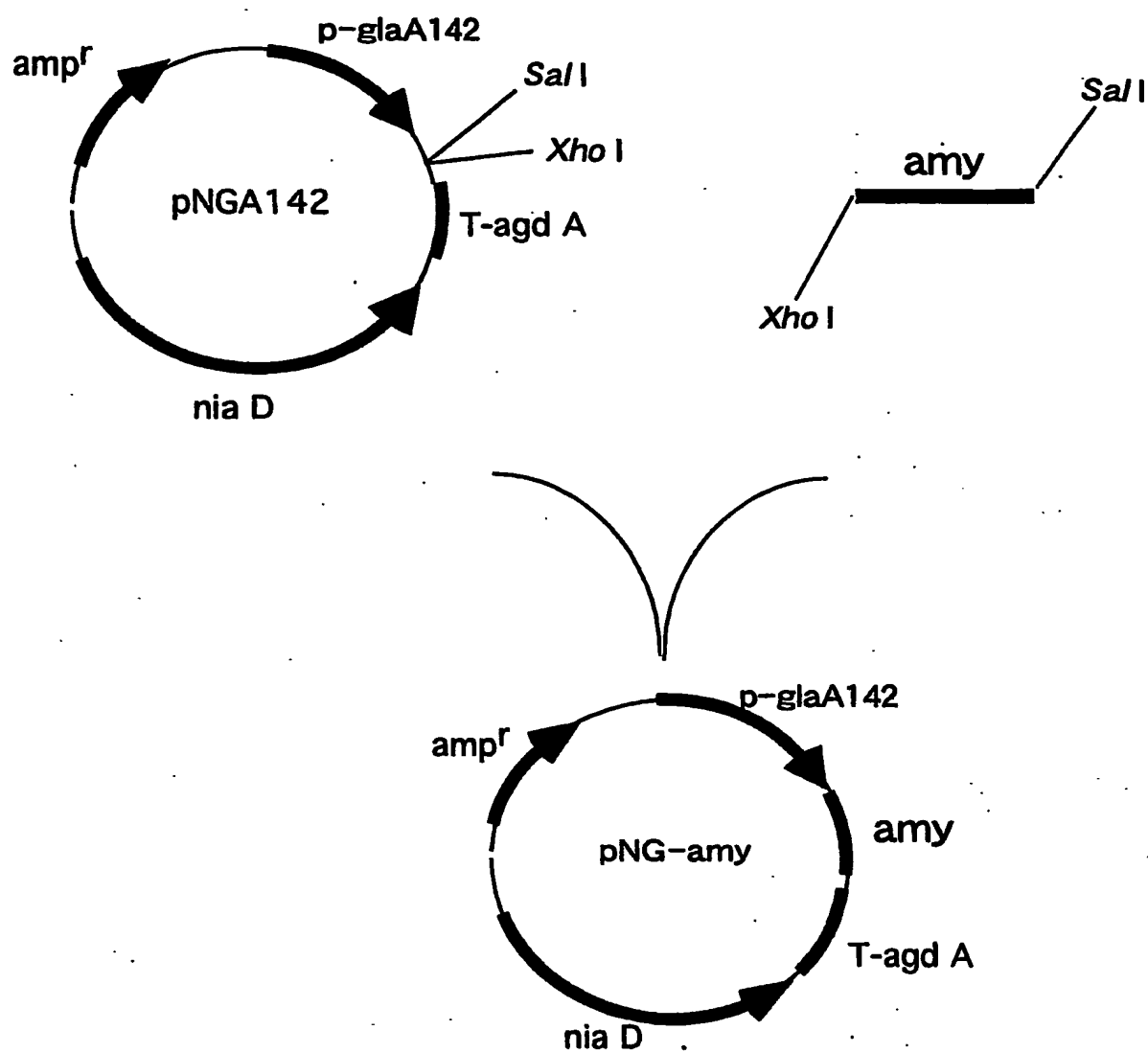


FIG. 13

13/28

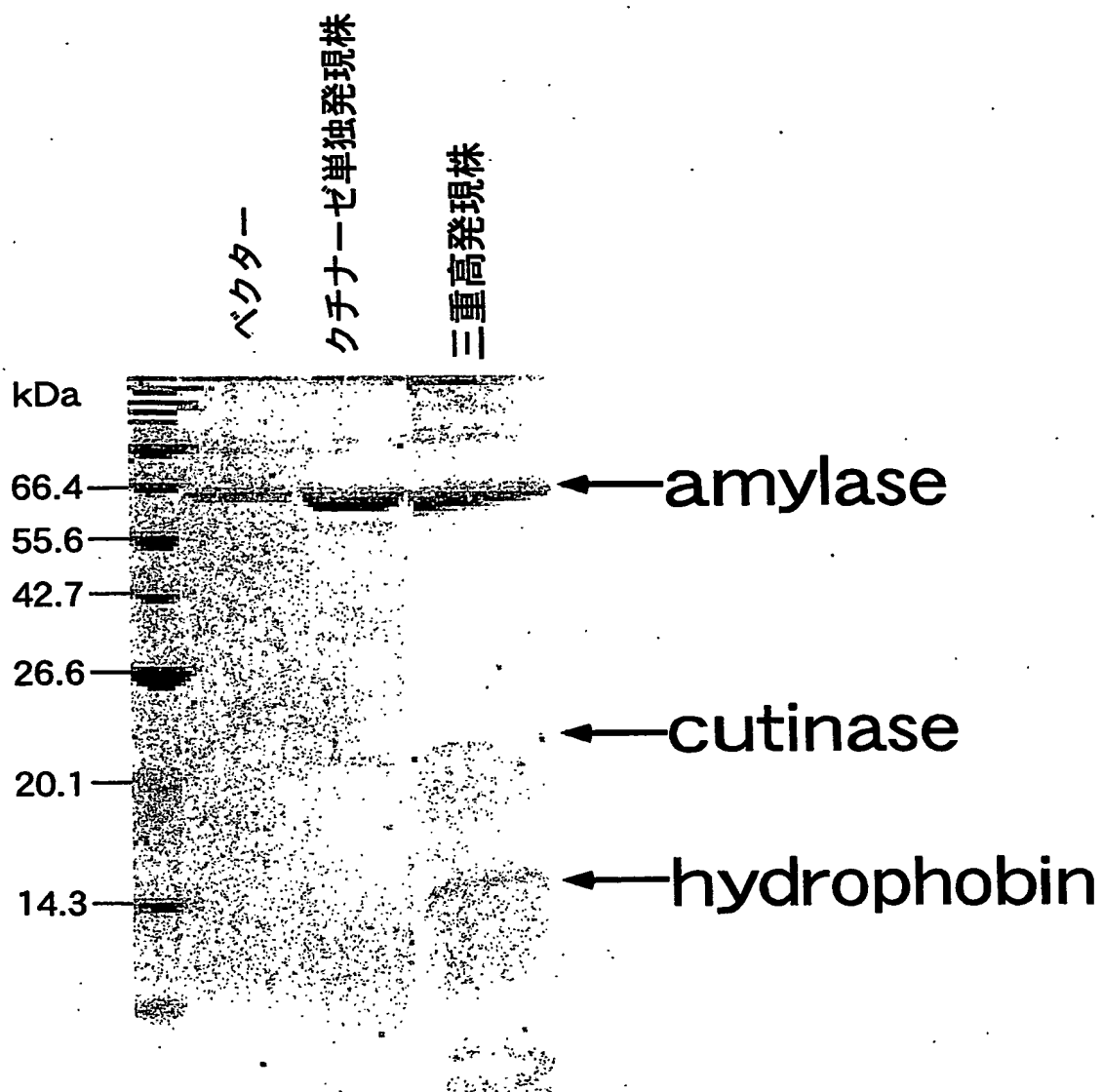


FIG. 14



1 4/2 8

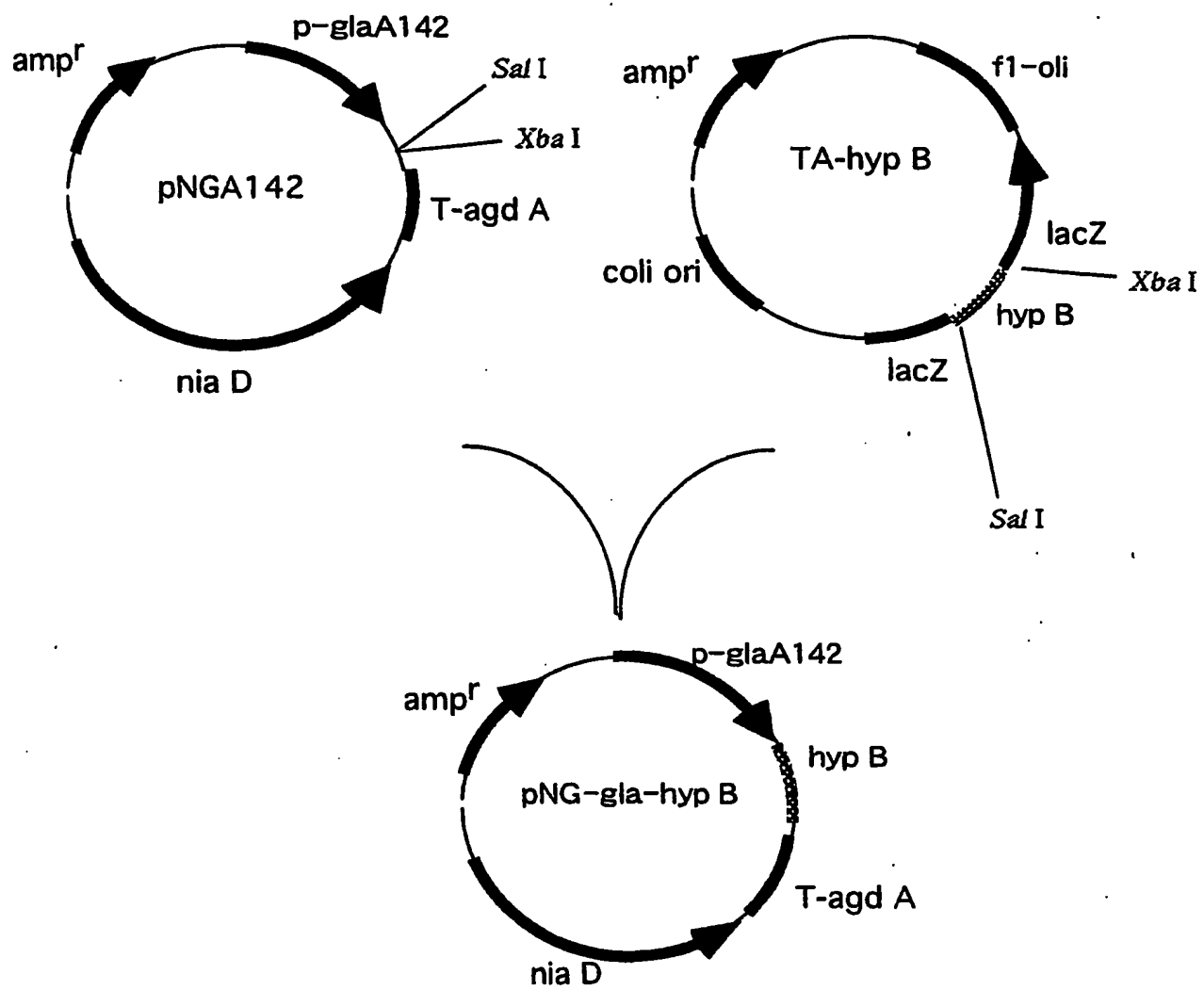


FIG. 15

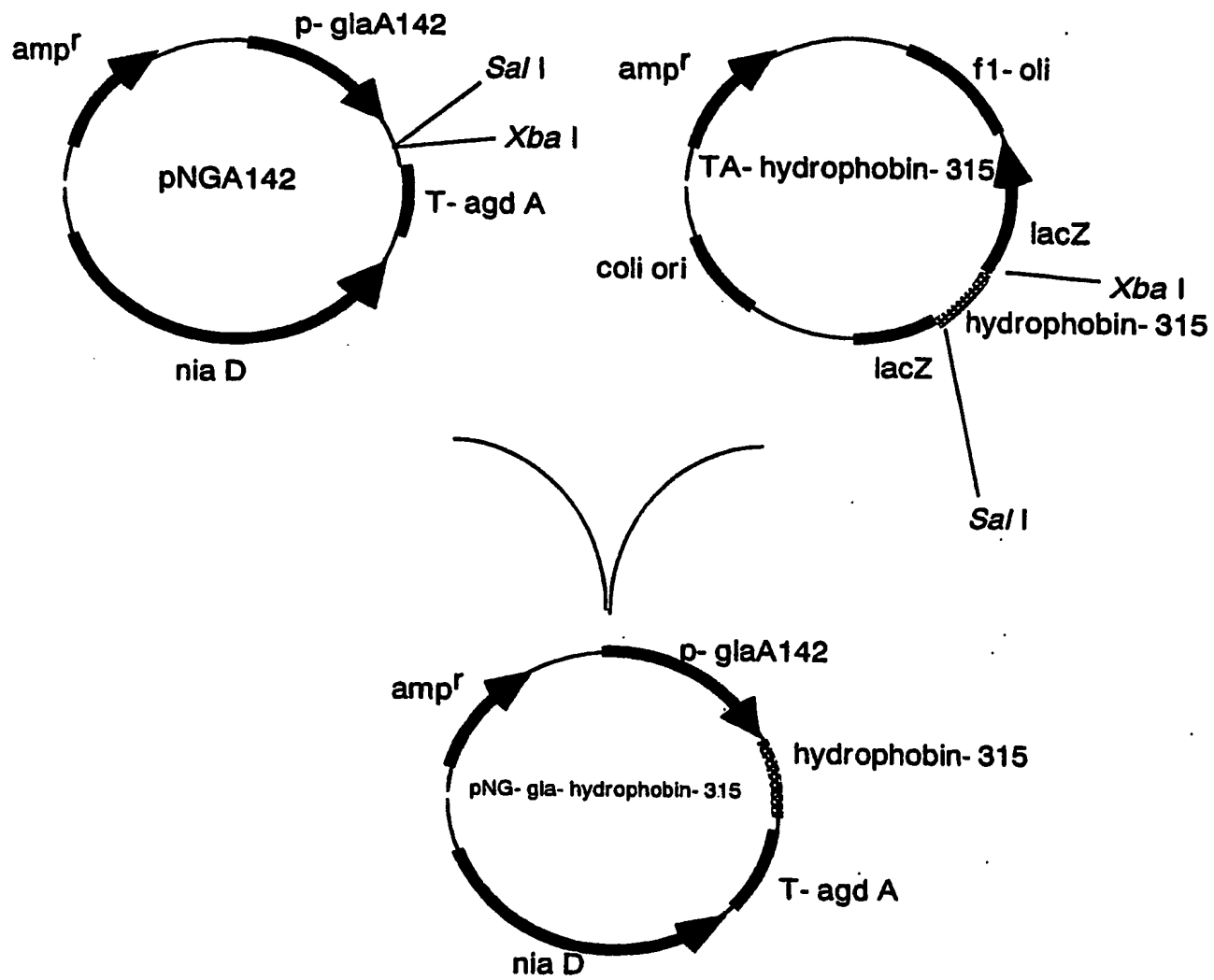


FIG. 16

1 6/2 8

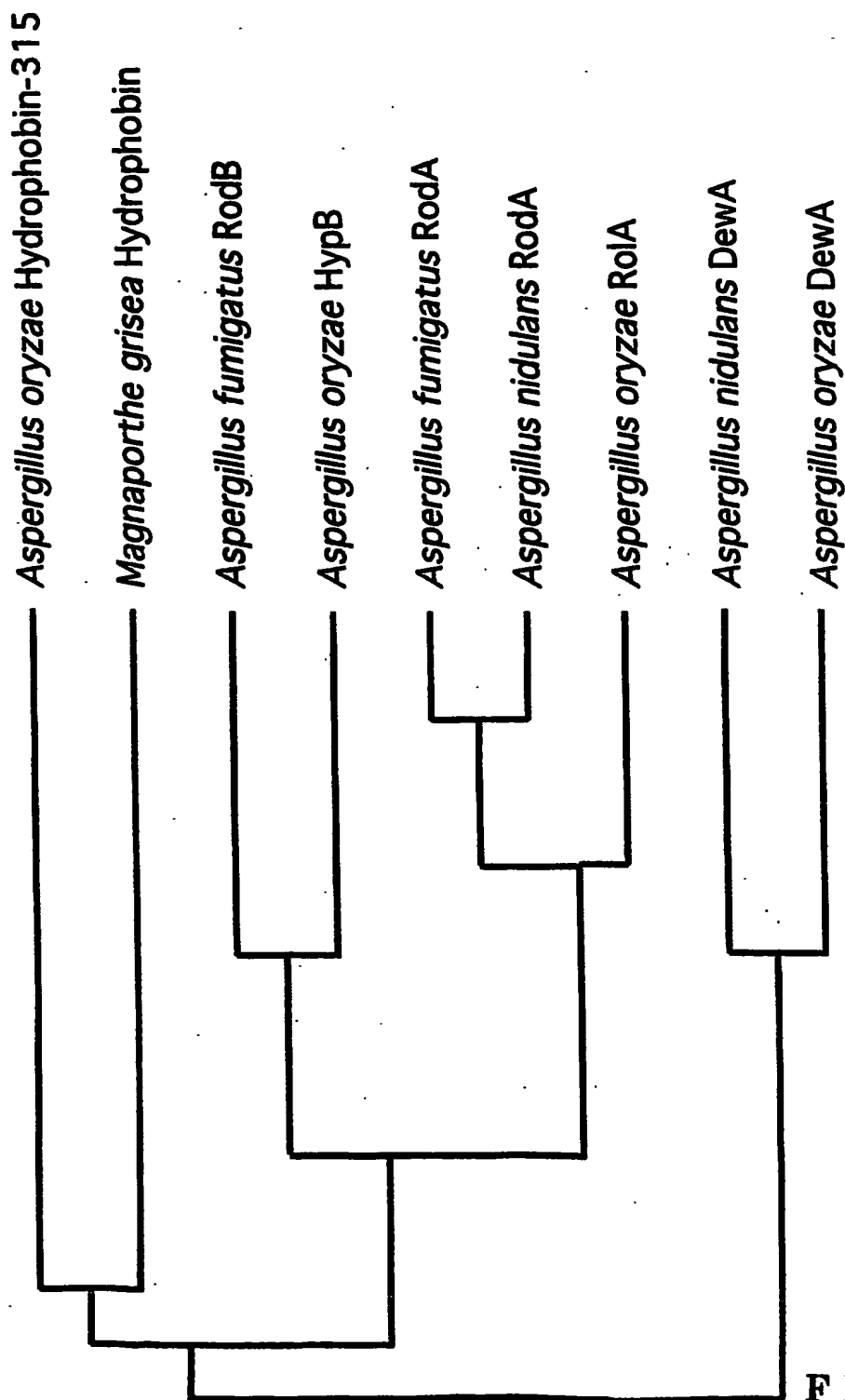
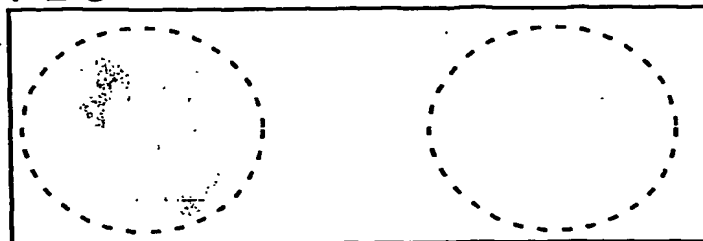


FIG. 17

PBS



2.5  $\mu$ g/mL 精製  
hydrophobin (Rol A)

トリス緩衝液 pH8.0

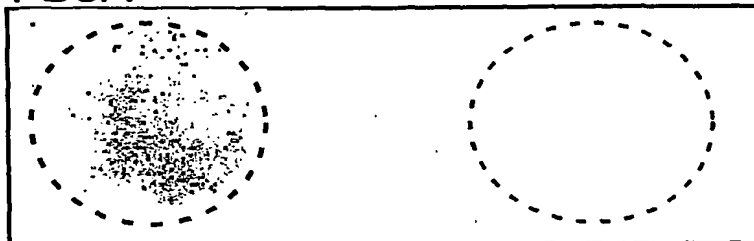
PLA



2.5  $\mu$ g/mL 精製  
hydrophobin (Rol A)

トリス緩衝液 pH8.0

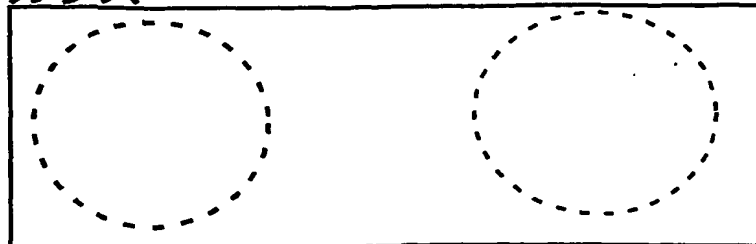
PBSA



2.5  $\mu$ g/mL 精製  
hydrophobin (Rol A)

トリス緩衝液 pH8.0

ガラス



2.5  $\mu$ g/mL 精製  
hydrophobin (Rol A)

トリス緩衝液 pH8.0

FIG. 18

差替え用紙 (規則26)

1 8/2 8

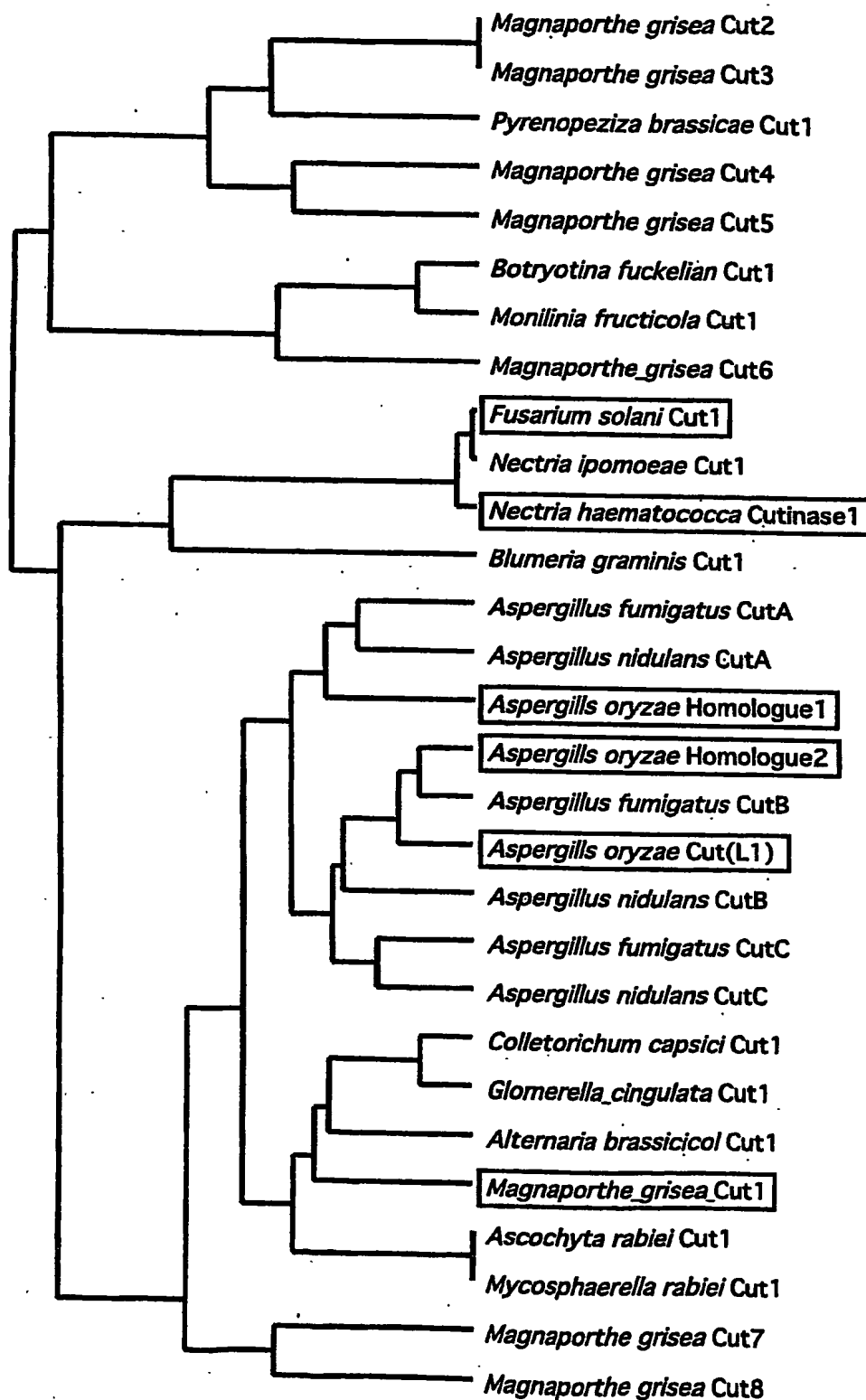
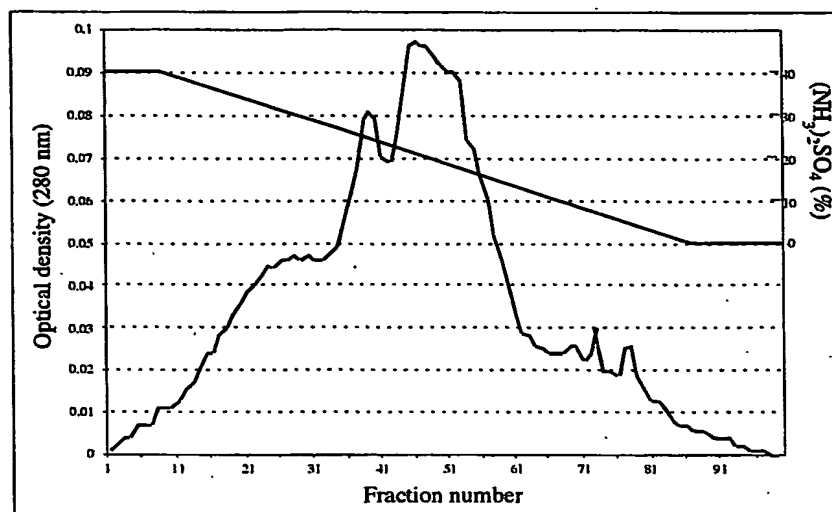


FIG. 19

19 / 28



オクチルセルロファインカラムの溶出画分中のタンパク質濃度



← 14.3 kDa  
DASAVLADFNTLST

↔  
フラクション80-90

FIG. 20

20/28

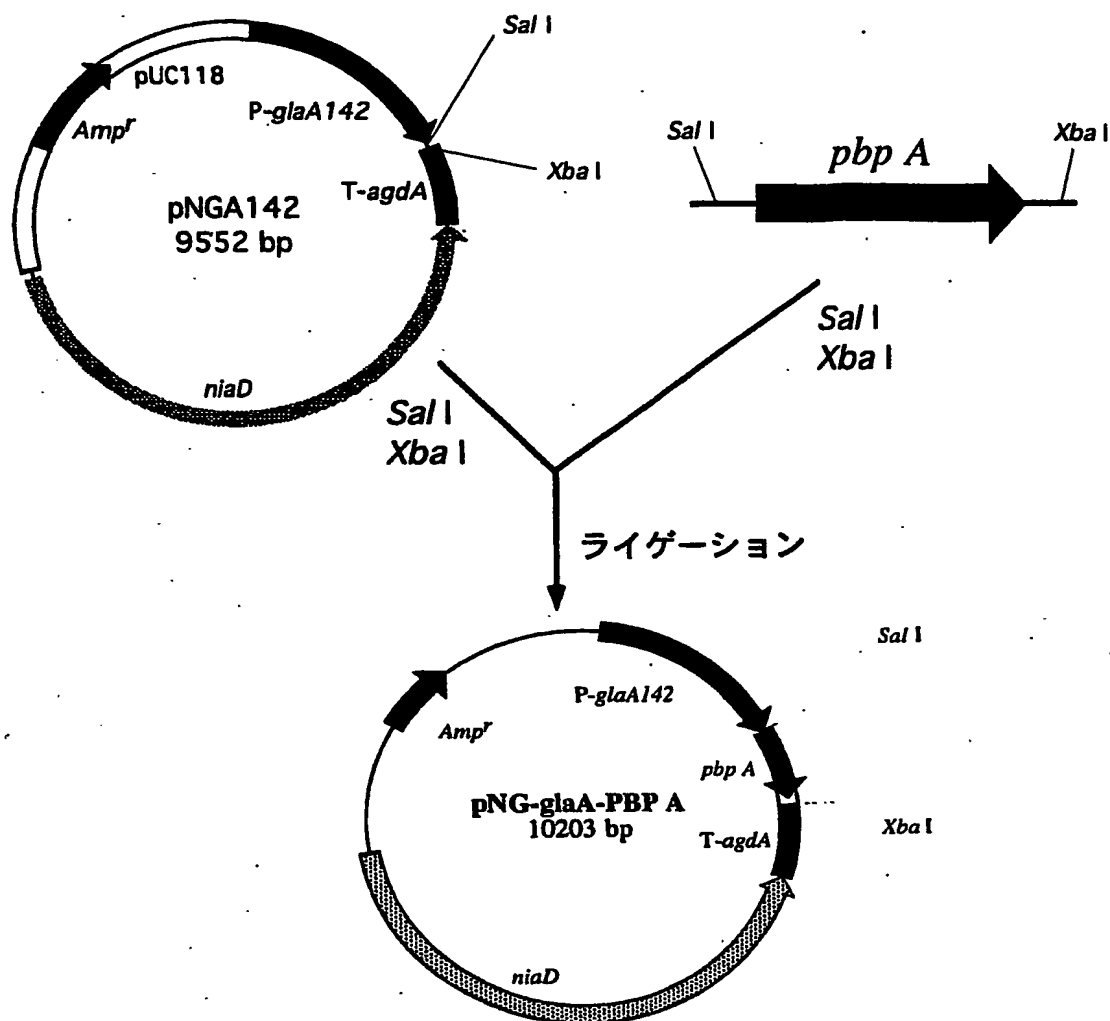


FIG. 21

21 / 28

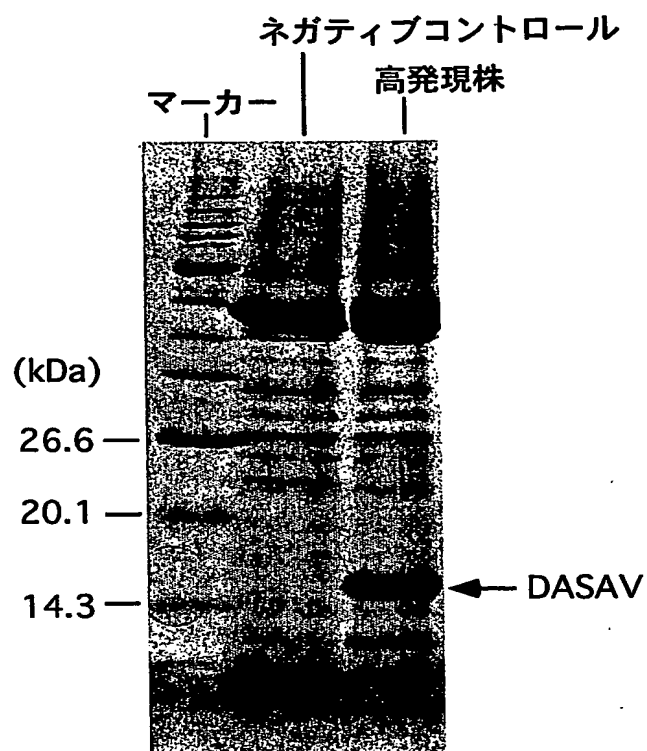


FIG. 22





23 / 28

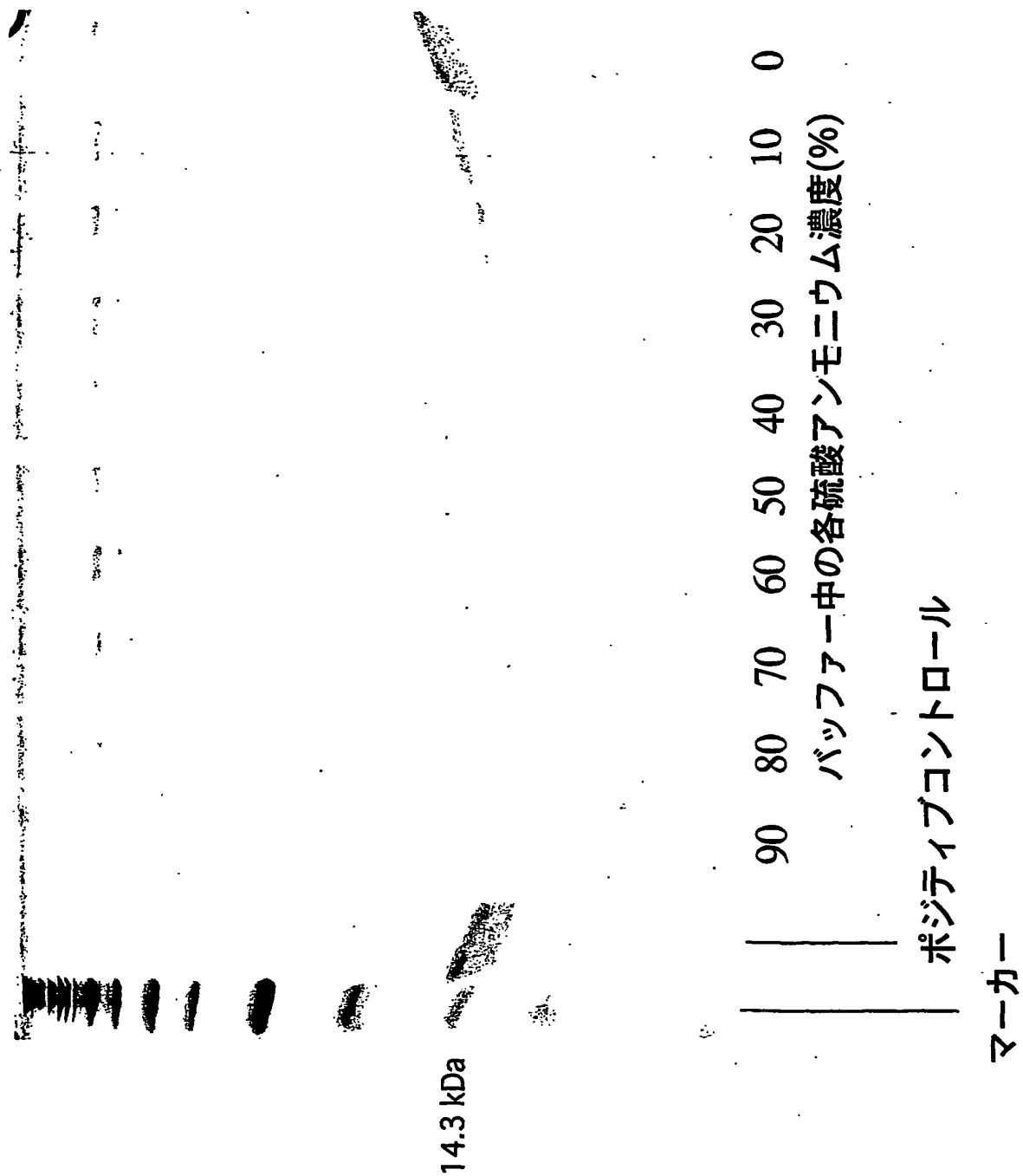


FIG. 24

差替え用紙 (規則26)

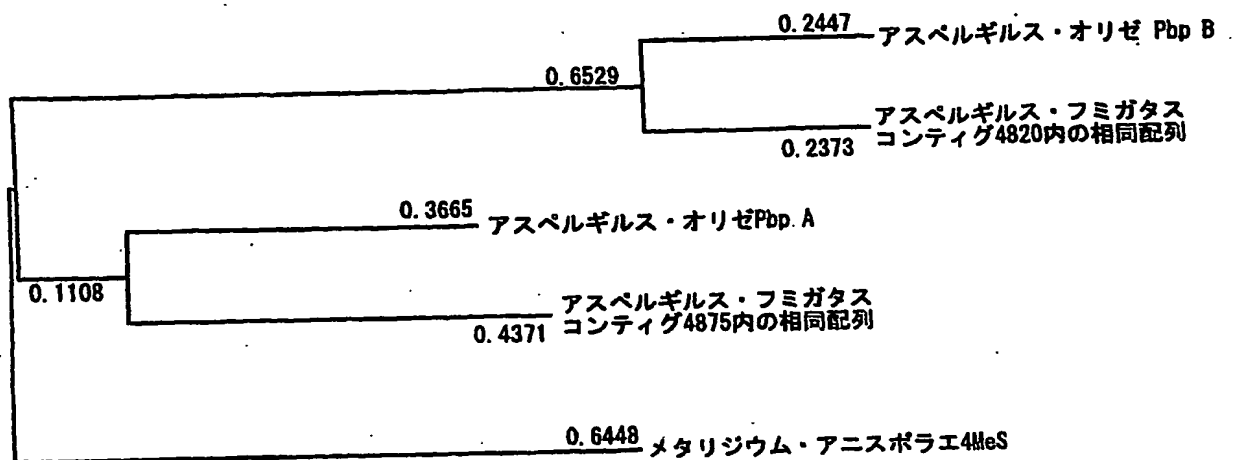


FIG. 25

25 / 28

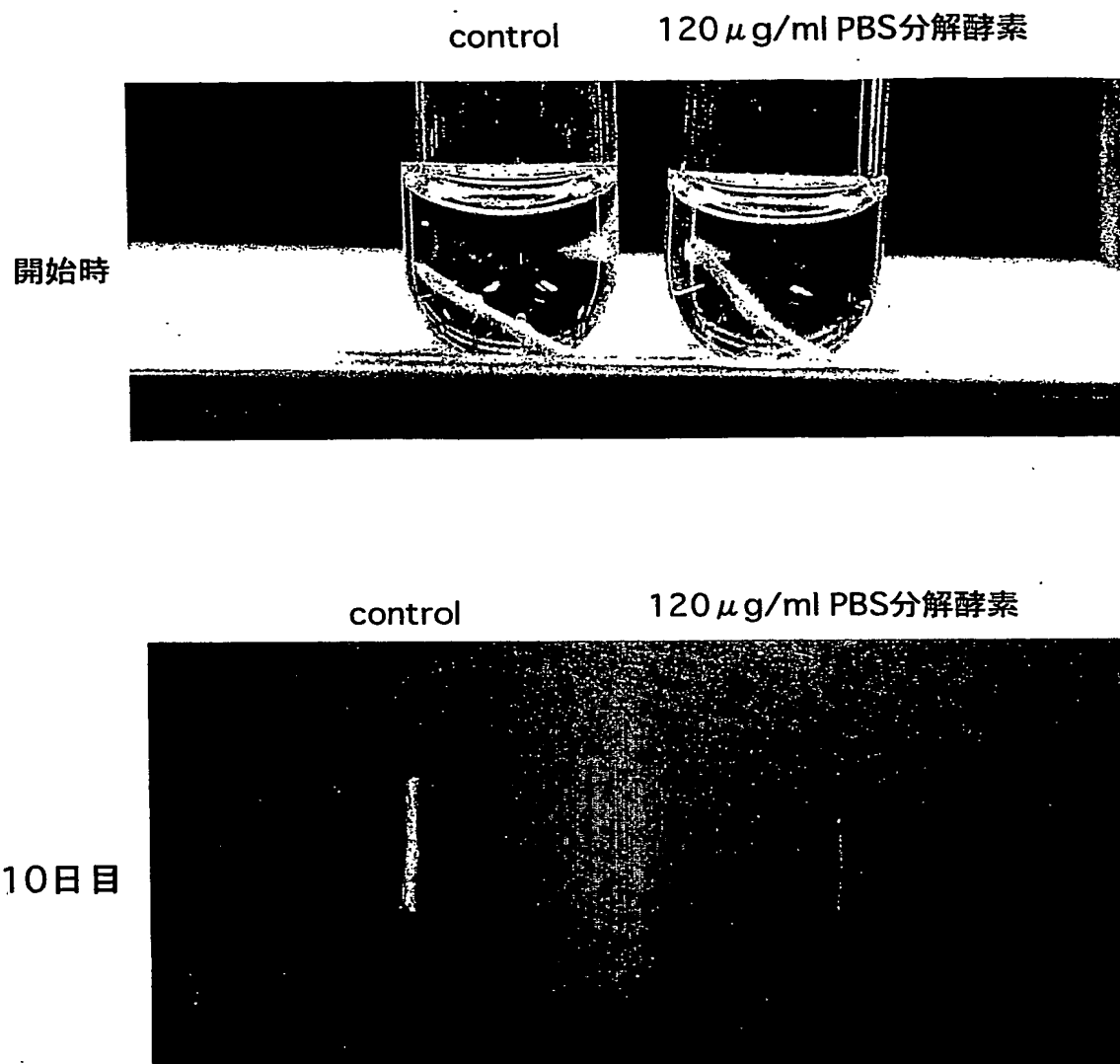
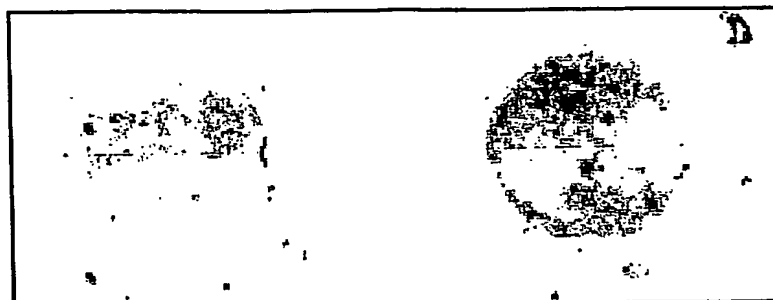


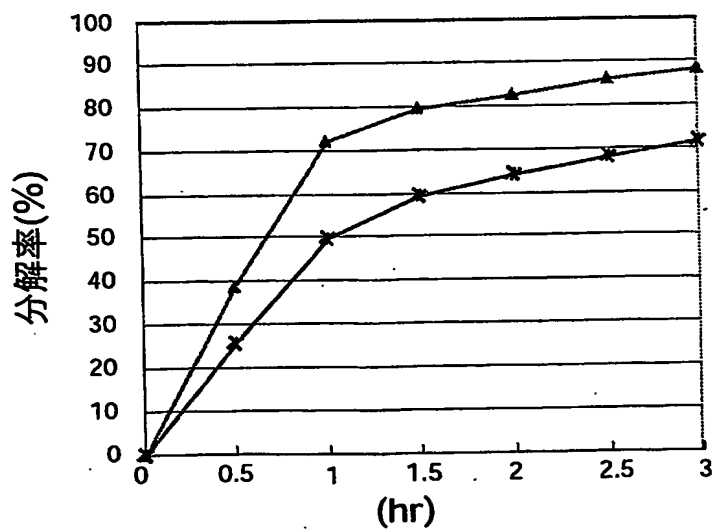
FIG. 26

26 / 28



20  $\mu$ g/ml cutinase    2.5  $\mu$ g/ml RolA + 20  $\mu$ g/ml cutinase

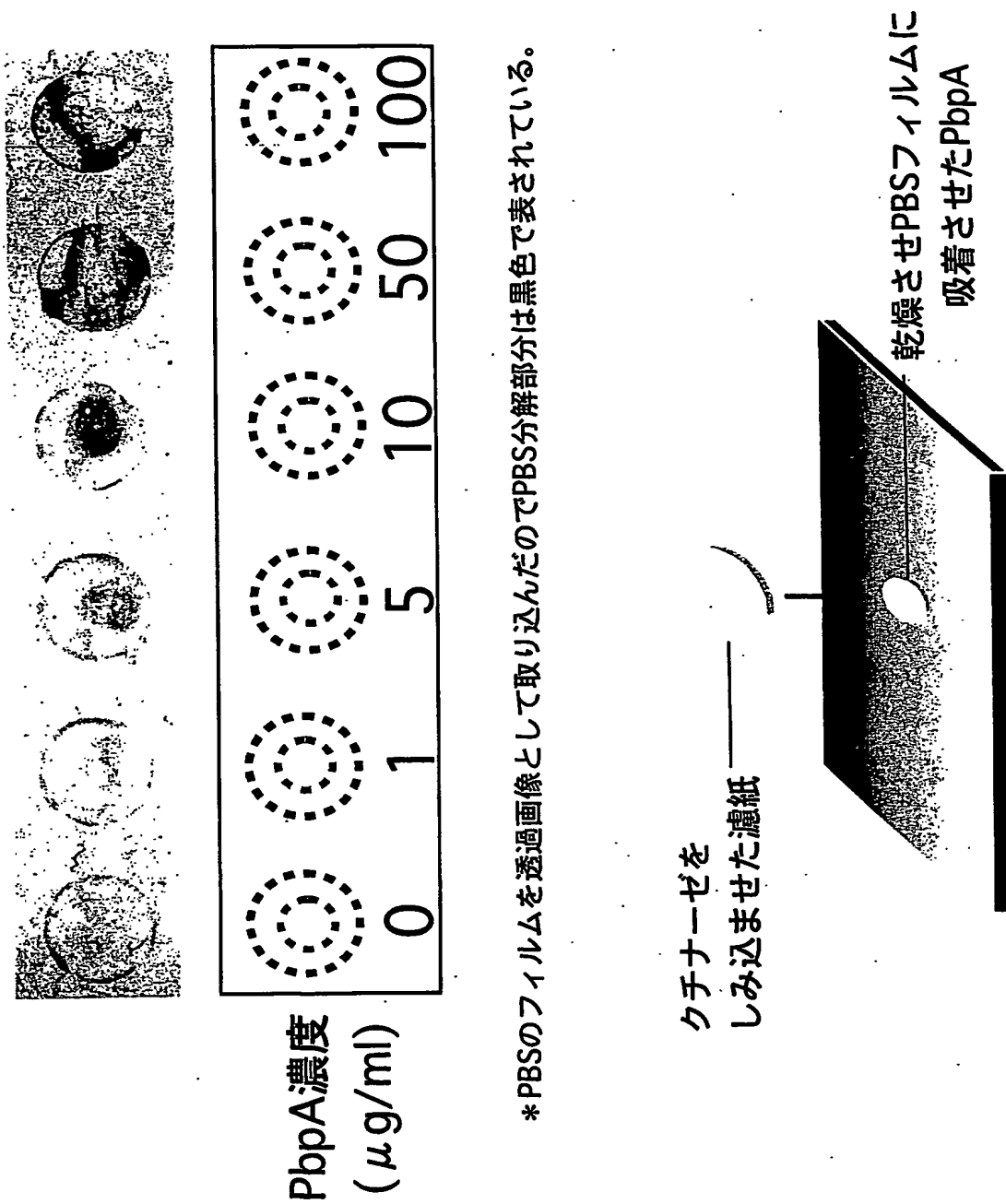
FIG. 27



RolAのcutinaseによるPBS分解促進効  
—△— RolA (0.025  $\mu$ g/ml) + cutinase (50  $\mu$ g/ml)  
—×— cutinase (50  $\mu$ g/ml)

FIG. 28

差替え用紙 (規則26)



\*PBSのフィルムを透過画像として取り込んだのでPBS分解部分は黒色で表されている。

FIG. 29

28 / 28

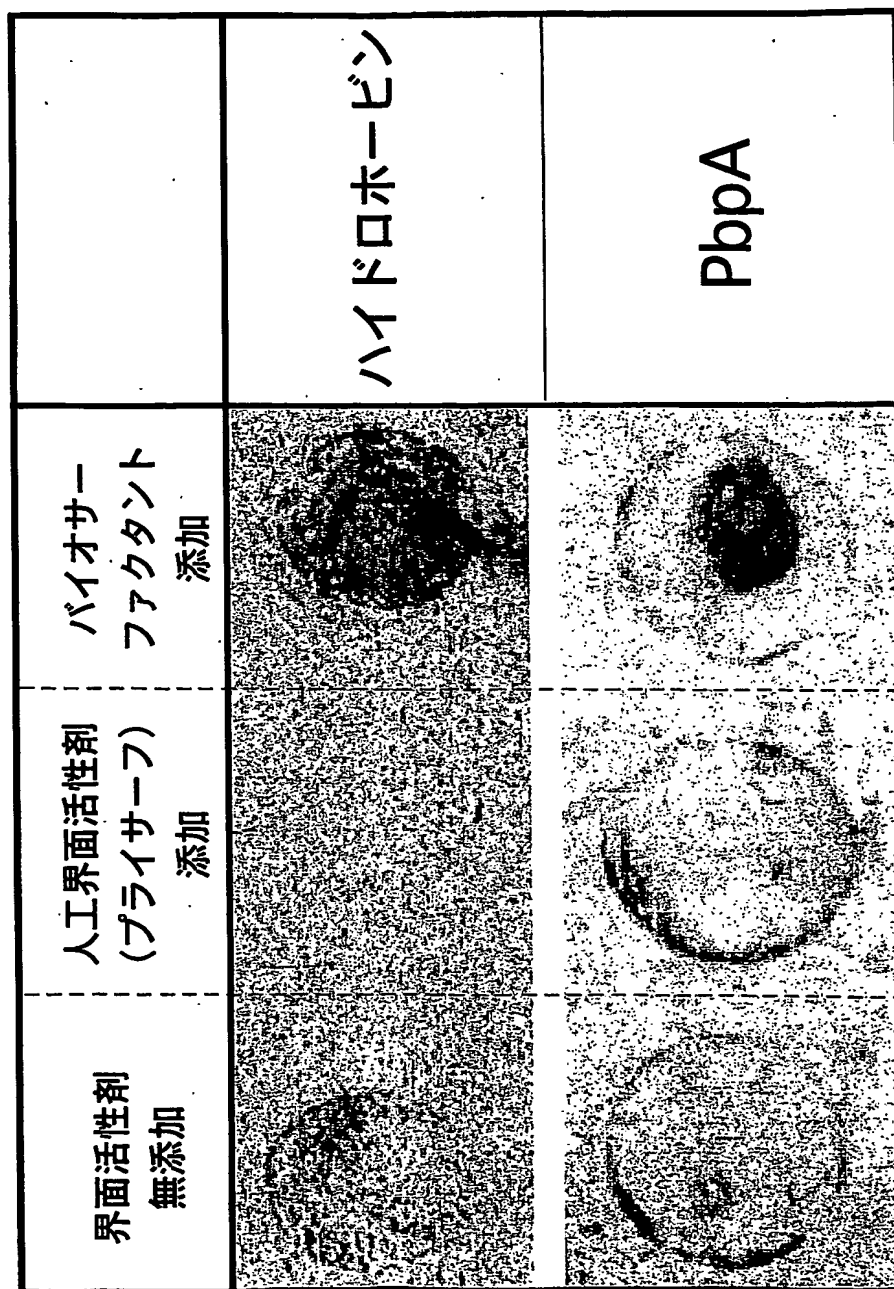


FIG. 30

差替え用紙 (規則26)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**